

UNIVERSITÉ DE PARIS

FACULTÉ DE PHARMACIE

Année 1928-1929

N° 10

**Influence de la réaction du milieu
sur la
germination des spores
de quelques Mucorinées**

THÈSE

pour l'obtention du diplôme de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS (PHARMACIE)

PRÉSENTÉE ET SOUTENUE LE

1929

PAR

R. CESBRON

Pharmacien, Ancien Interne des Hôpitaux de Paris
Ancien Elève de l'Institut Pasteur

JURY : { MM. RADAIS, *Président.*
LUTZ, *Professeur.*
BACH, *Agrégé.*

SAINT-DIZIER

ÉTABLISSEMENTS ANDRÉ BRULLIARD

1929

UNIVERSITÉ DE PARIS

FACULTÉ DE PHARMACIE

Année 1928-1929

N° 10

Influence de la réaction du milieu
sur la
germination des spores
de quelques Mucorinées

THÈSE

pour l'obtention du diplôme de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS (PHARMACIE)

PRÉSENTÉE ET SOUTENUE LE

1929

PAR

R. CESBRON

Pharmacien, Ancien Interne des Hôpitaux de Paris
Ancien Elève de l'Institut Pasteur

JURY : { MM. RADAIS, *Président.*
LUTZ, *Professeur.*
BACH, *Agrégé.*

SAINT-DIZIER

ÉTABLISSEMENTS ANDRÉ BRULLIARD

—
1929

Personnel de la Faculté de Pharmacie

ADMINISTRATION

MM. RADAIS, *Doyen*, O. *, U I.
 PERROT, *Assesseur*, O. *, U I.
 G. DURSENT, *Secrétaire*, *, U I.

PROFESSEURS

MM. RADAIS, O. *, U I.	Cryptogamie et Microbiologie.
BÉHAL, Membre de l'Institut,	
C. *, U I.	Chimie organique.
PERROT, O. *, U I.	Histoire naturelle des Médicaments.
COUTIERE, O. *, U I.	Zoologie.
GRIMBERT, *, U I.	Chimie biologique.
LEBEAU, O. *, U I.	Pharmacie chimique.
DELÉPINE, O. *, U I.	Hydrologie et Hygiène.
GUERBET, *, U I.	Toxicologie.
BOUGAULT, *, U I.	Chimie analytique.
GORIS, *, U I.	Pharmacie galénique.
GUÉRIN, *, U I.	Botanique générale.
TASSILLY, *, U I.	Physique.
N....	Chimie minérale.

Professeurs honoraires : MM. MOUREU, G. O. *, U I. et A. VILLIERS, *, U I.

CHARGÉS DE COURS

MM. DAMIENS, *, U I.	Minéralogie.
MARC HONNORAT, *, U I.	Législation, Déontologie pharmaceu- tique.
LUTZ, *, U I.	Cryptogamie.

AGRÉGÉS EN EXERCICE

MM. SOMMELET, *, U I.	MM. HÉRISSEY, *, U I.	MM. MASCRÉ, *, U I.
DAMIENS, *, A.	DELABY, *, A.	FLEURY, *, U I.
LUTZ, *, U I.	PICON, U I.	BACH, *, U I.
LAUNOY, *, A.	FABRE, *, A.	

CHEFS DES TRAVAUX PRATIQUES

MM. DEFACQZ, *, U I.	Chimie générale.
SOMMELET, *, U I.	
FABRE, A., <i>agréés,</i>	
chargés des travaux de	Chimie analytique.
SOUÈGES, U I.	Micrographie.
LEROUX, U I.	Physique.
DEVAL, U I.	Microbiologie.

Agrégés chargés des Travaux généraux de 4^e année.

HÉRISSEY, *, U I. DELABY, *, A. PICON, U I.

Bibliothécaire en Chef : M. BEAULIEUX, U I.

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

A MONSIEUR LE PROFESSEUR RADAIS

DOYEN DE LA FACULTÉ DE PHARMACIE

Hommage de respectueuse reconnaissance

A MONSIEUR D. BACH

PROFESSEUR AGRÉGÉ A LA FACULTÉ DE PHARMACIE
PHARMACIEN DES HÔPITAUX DE PARIS
DOCTEUR ES-SCIENCES NATURELLES

Témoignage de sincère gratitude et de respectueux dévouement.

INTRODUCTION

La récente notion de réaction de milieu suggère de nombreux problèmes, dont les rapports avec les données actuellement acquises n'ont pas été entièrement mis en lumière.

Ainsi, en physiologie, les limites de germination des spores ont tout d'abord été déterminées, mais les auteurs américains semblent les premiers avoir relevé des irrégularités inattendues et notamment l'existence d'un minimum situé entre deux maximums, quand ils comparent le pourcentage de germination à la réaction des milieux.

Ce minimum existe-t-il réellement ? Et dans l'affirmative coïncide-t-il avec le point isoélectrique des protéines du champignon ou avec celui de la solution du milieu de culture ? Doit-on l'attribuer à une ionisation plus faible et par suite à une assimilation ralentie ? Ou dépend-il simplement de la perméabilité cellulaire ?

Autant de questions que nous nous sommes efforcés de résoudre par les expérimentations qui suivent.

Nous tenons à remercier ici M. le Professeur RADAIS, doyen de la Faculté, d'avoir mis si obligeamment son laboratoire à notre disposition et de l'honneur qu'il nous a fait en acceptant la présidence de cette thèse.

Ce travail nous a été inspiré par M. le Professeur agrégé BACH qui voudra bien accepter le témoignage de notre vive reconnaissance, pour l'orientation qu'il a donnée à ces recherches, pour les conseils éclairés qu'il n'a cessé de nous prodiguer et pour les encouragements bienveillants qu'il nous adressa au cours de cette étude.

Tous nos remerciements vont également à M. le Professeur LUTZ qui a bien voulu faire partie du Jury et nous le prions d'agréer nos respectueux hommages.

HISTORIQUE

C'est WEBB (1) qui paraît être le premier à avoir signalé l'existence, dans les courbes de croissance d'un microorganisme en fonction de la réaction, d'un minimum compris entre deux maximums.

Il étudiait la germination, en gouttes pendantes, des spores de divers champignons : *Aspergillus niger*, *Penicillium cyclopium*, *Fusarium sp.*, *Botrytis cinerea*, *Lenzites saepiaria* dans des milieux dont le pH variait régulièrement. La plupart de ces espèces germent depuis pH 2,5 jusqu'à pH 8 avec un optimum à pH 3 et parfois un deuxième optimum vers pH 7 (*Fusarium sp.*, *Penicillium cyclopium*).

Ce fait, retrouvé depuis par de nombreux auteurs, non seulement chez les champignons et chez les bactéries, mais encore chez les Phanérogames, a beaucoup intrigué les physiologistes et malgré de nombreuses recherches, on ne peut pas dire qu'il ait reçu une explication satisfaisante.

Les premiers auteurs qui ont étudié l'influence de la réaction sur la germination et le développement des champignons ne pouvaient le soupçonner. La technique mise en œuvre et les procédés utilisés pour apprécier et évaluer les différences de réaction entre les milieux étudiés ne se prêtaient pas à une analyse aussi fine des phénomènes.

Aussi, quel que soit l'intérêt que présentent, de par ailleurs, les travaux de LIROSSIER et ROUX, KRONIG et PAUL, STEVENS, CLARK, DUGGAR, BROOKS, RITTER, COOLEY, nous ne pouvons les retenir ici. Cependant certains d'entre eux sont intéressants par les détails qu'ils donnent sur la technique même des cultures en gouttes pendantes. Nous les retrouverons ailleurs.

A partir de 1915 environ, en Amérique, les mycologues se mettent à déterminer la concentration en ions hydrogène de leurs milieux, et expriment cette valeur par le symbole de SÖRENSEN. Les premiers résultats se révélèrent très féconds, d'où l'apparition d'un très grand nombre de travaux ayant pour but de déterminer l'influence de la réaction sur la germination et la culture des champignons.

On s'attacha tout d'abord à préciser les limites du pH entre lesquelles la germination peut s'effectuer. De cette époque datent les

travaux de ZELLER, CURRIE, GILLESPIE, MEACHAM, STEINBERG, ZELLER, SCHMITZ et DUGGAR.

ZELLER en 1916 montre que le *Lenzites sæpiaria* ne germe que sur milieux faiblement acides. On savait depuis longtemps que l'*Aspergillus niger* aime les milieux très acides. TANRET (1, 2) dès 1896 l'avait mis en évidence. Aussi ne faut-il pas s'étonner des résultats de CURRIE qui voit cette espèce germer encore à pH 1,4. Cet auteur établit les conditions d'acidité optimum pour obtenir des rendements élevés dans la fermentation citrique par cette espèce.

La plupart des moisissures banales se comportent de même, ainsi qu'il résulte des travaux de ARMSTRONG, KARRER, BOYLE, MOORE, KLOTZ, BACH, etc.

Les champignons à chapeau et les espèces pathogènes pour les végétaux possèdent des limites à peine moins étendues. Ainsi les quatre espèces lignicoles étudiées par MEACHAM (*Lenzites sæpiaria*, *Fomes roseus*, *Coniophora cerebella*, *Merulius lacrymans*) germent encore jusqu'à pH 1,9. L'arrêt total ne se produit qu'à pH 1,7.

SCHMITZ puis ZELLER, SCHMITZ et DUGGAR, continuant ces études sur les champignons destructeurs des bois, notent également la très grande indifférence de ces organismes à l'égard de la concentration en ions H.

WOLPERT en 1924 confirme et précise ces résultats.

Les véritables parasites sont un peu plus exigeants. Ainsi BRIGHTMANN, MEACHAM, ACREE (1920) montrent que l'*Endothia parasitica* se développe depuis pH 2,5 jusqu'à pH 8,5. Par contre le *Sclerotinia apothecia* étudié par EZEKIEL (1923) ne se développe qu'entre pH 2,5 et pH 7,7.

Ces limites sont encore plus resserrées pour les Actinomycètes rencontrés dans le sol et étudiés par GILLESPIE 1918, par GAYNEY 1918, par WAKSMAN et JOFFE 1920, NÄSSLUNG et DERNBY 1923.

C'est en 1919 que WEBB (1) découvre dans certaines courbes de croissance en fonction du pH l'existence de deux maximums distincts, séparés par une zone où le développement est très faible.

Les études de WEBB portaient sur de nombreuses espèces : *Botrytis cinerea*, *Aspergillus niger*, *Penicillium cyclopium*, *Lenzites sæpiaria*, *Fusarium* sp. Chez trois de ces espèces au moins, *Penicillium cyclopium*, *Fusarium* sp. et *Aspergillus niger*, on observe un premier optimum vers pH 3, puis le pourcentage des spores germées diminue dans les milieux moins acides, pour se relever et présenter un deuxième optimum vers pH 7. Ce second optimum est le plus souvent moins prononcé que le premier.

WEBB signala le fait sans donner d'explications.

Presque à la même date BRIGHTMANN, MEACHAM et ACREE donnent, pour le développement de l'*Endothia parasitica* en fonction du pH, des courbes dont certaines présentent peut-être ce double maximum. Il y aurait un premier maximum très net vers pH 4,5 et un deuxième peu prononcé vers pH 7.

HOPKINS 1922 retrouve le même fait chez un champignon parasite, le *Gibberella Saubinetii* (Mont.) Sacc., cultivé sur des décoccions de pommes de terre, amenées à des pH variés par addition de divers acides. Ici aussi on observe deux optimums avec un minimum intermédiaire qui est situé, suivant les cas, entre pH 5,5 et pH 6,3. Le phénomène est encore très net au 17^e jour, et il paraît bien indépendant des substances utilisées pour l'ajustage des milieux.

WEBB en 1921 reprend son travail de 1919 sur un plus grand nombre d'espèces, mais en opérant cette fois sur des milieux très variés : eau distillée, solutions de mannite $\frac{N}{5}$, solutions de peptone, milieu de CZAPEK (où le saccharose est remplacé par la mannite), infusions de betteraves, qu'il ajuste à des pH variés de pH 1,2 à pH 10. Pour éviter les modifications de la réaction à l'autoclave il ne mélange milieux à ajuster et acide titré (ou alcali) qu'après stérilisation. Enfin les milieux ne sont utilisés que 24 heures après leur préparation.

Les germinations sont effectuées en cellules de VAN TIEGHEM et LE MONNIER et observées à deux ou trois reprises. L'auteur donne, sous forme de tableaux, les pourcentages des germinations obtenues dans chaque cellule.

Les divers milieux utilisés se montrent inégalement favorables à la germination. L'infusion de betteraves permet la germination dans les limites les plus étendues, surtout du côté acide. La peptone constitue également un milieu très convenable, surtout du côté alcalin.

Le phénomène du double maximum s'observe chez presque toutes les espèces étudiées : *Aspergillus niger*, *Penicillium cyclopium*, *Penicillium italicum*, *Fusarium* sp., *Lenzites saepiaria*, *Puccinia graminis*, mais pour certains milieux seulement. Celui de CZAPEK paraît le plus favorable à ce genre de recherches.

Le *Penicillium cyclopium* et le *Fusarium* donnent très nettement et pour tous les milieux un premier maximum du côté acide, puis un deuxième vers pH 7, égalant d'ailleurs presque le premier. L'auteur insiste ensuite sur ce que le pH le plus favorable à la germination

n'est pas nécessairement celui du développement ultérieur; fait qui a été confirmé par beaucoup d'auteurs et dont BACH a analysé le mécanisme dans une foule de cas. La toxicité des ions H est bien indépendante des autres facteurs étudiés. Au contraire, l'action des ions OH varie suivant la composition du milieu.

BOYLE en 1924 est amené incidemment à s'occuper du phénomène, au cours de ses études sur l'influence des produits du métabolisme de certains champignons, sur la germination des spores d'autres espèces. Il ne retrouve pas, chez le *Fusarium* étudié et chez le *Botrytis cinerea*, les faits signalés par WEBB. Il faut d'ailleurs remarquer que sa méthode de travail n'était pas adaptée à ce genre de recherches, car le pH de ses milieux de culture variait de 0,7 à 1,2 pH pour 2 solutions consécutives.

La même année PRATT, dans un travail du même ordre, confirme les observations de BOYLE.

Enfin LUNDEGÅRDH (H.) 1924 a retrouvé des courbes analogues pour le *Gibberella Saubinetii*. A la pesée des récoltes, d'abord utilisée, l'auteur a substitué la mesure de l'intensité respiratoire, comme infiniment plus précise.

La première étude d'ensemble du phénomène est due à ROBBINS (1). Celui-ci a pu confirmer les résultats de WEBB avec le *Rhizopus nigricans* et le *Fusarium lycopersici* et trouve, dans un examen critique de la littérature, un certain nombre d'observations du même ordre. Ces résultats sont fournis dans quelques cas par les bactéries et les champignons, mais surtout par les Phanérogames comme nous allons le voir.

Mais le mérite principal de ROBBINS est d'avoir émis une hypothèse générale pour expliquer ce trouble de la nutrition que révèle l'existence d'un minimum dans une zone où la concentration des ions H n'est pas toxique et d'avoir cherché à la vérifier.

Depuis quelque temps, LOEB insistait sur l'existence d'un point isoélectrique chez les protéines et montrait les curieuses variations de propriétés physiques que présentent, à ce niveau, les protéines colloïdales. Au point isoélectrique, on observe, dans la gélatine par exemple, non seulement un minimum de conductibilité, mais encore un minimum de gonflement, de pression osmotique, de solubilité, de viscosité.

Ces modifications dans les propriétés physiques sont caractéristiques de l'état de la protéine considérée sous cette forme, et par suite, leur mise en évidence peut servir à déterminer le point isoélectrique, quand les expériences de cataphorèse sont inapplicables.

Les tissus vivants posséderaient aussi un point isoélectrique. Cela est conforme à la théorie quand il s'agit d'organismes monocellulaires à dimensions colloïdales comme les bactéries. Une suspension de corps bactériens est comparable à une suspension colloïdale, le corps bactérien étant le support inerte de charges électriques qui s'annulent au moment du passage au point isoélectrique.

Cela est vrai, pour une raison différente, quand il s'agit de tissus formés d'albumines simples, comme les hématies (point isoélectrique à pH 4,6 d'après COULTER).

Est-ce vrai pour des tissus complexes comme un fragment de muscle, de peau, comme un fragment de tubercule de pomme de terre ou un mycélium de Champignon ?

Ici l'hypothèse n'est rien moins que démontrée et se heurte à des objections théoriques et pratiques que nous développerons plus loin. Sans s'arrêter à ces objections, ROBBINS admet que chaque tissu possède un point isoélectrique propre, ce qui permet d'expliquer tout commodément les courbes de WEBB par des modifications profondes dans les propriétés physico-chimiques des protéines, entraînant une croissance ralentie.

ROBBINS a effectivement montré que certaines propriétés physiques des tissus passaient par un minimum pour un certain pH.

1° Adsorption d'eau et gonflement. ROBBINS découpe à l'emporte-pièce des rondelles de pomme de terre qu'il lave, essore, réunit par lots de 10 et plonge dans des solutions tampons ajustées à divers pH.

On constate par pesées avant et après que les disques de pomme de terre absorbent des quantités d'eau qui peuvent différer entre elles de 25 %.

L'absorption d'eau est fonction du pH et les courbes représentatives pour chaque mélange tampon montrent un minimum compris entre 2 maximums. Le minimum définirait le point isoélectrique du tissu. En fait, les minimums observés se placent à pH 5,8-6 dans les tampons au phosphate, pH 5,5-5,7 dans ceux au citrate et à pH 6,2-6,25 dans ceux au phthalate.

2° Modification de la réaction du liquide externe. Dans les expériences précédentes on constate d'autre part que la réaction du liquide extérieur (tampon) est peu modifiée au voisinage du point isoélectrique du tissu (de pH 5,5 à pH 6,2).

Au contraire les solutions plus riches en ions H sont alcalinisées et les solutions plus riches en ions OH sont acidifiées. Tout se passe comme si le tissu était capable de neutraliser les acides par une substance alcaline et les alcalis par une substance acide.

Ce comportement des tubercules de pommes de terre apparaît ainsi comme une nouvelle preuve de l'existence d'un point isoélectrique chez les tissus végétaux.

3° Adsorption et fixation des colorants.

Cette méthode, qui a servi à THOMAS et KELLEY à déterminer le point isoélectrique de la poudre de peau, a été appliquée par ROBBINS à la pomme de terre.

Des disques de tubercule découpés à l'emporte-pièce sont placés, comme plus haut, dans des solutions tampons de réaction variable. Après 1 heure $\frac{1}{2}$ à 5 heures de contact, les disques sont retirés et placés dans un verre de montre en contact avec des colorants acides (éosine) ou alcalins (safranine, cristal violet, bleu de méthylène). Les colorants acides (éosine) ne se fixent que sur les disques ayant macéré dans les solutions acides. Le minimum se trouve entre pH 6,1 à pH 6,95 pour les tampons au phosphate, entre pH 6,2 à 6,5 pour les tampons au citrate.

Les colorants basiques sont difficiles à utiliser, car ils colorent fortement les grains d'amidon, ce qui masque la teinte propre du tissu. Cependant, avec quelques précautions, on peut observer un minimum entre pH 6,1 et pH 6,95.

4° Conductibilité électrique des tissus.

Enfin ROBBINS rappelle les expériences de OSTERHOUT sur la conductibilité électrique des tissus de Laminaires, quand la réaction du milieu ambiant varie régulièrement. Bien que les déterminations de pH n'aient pas été faites, les changements apparus rappellent ceux que l'on observe dans une solution pure de protéine, dont la réaction varie progressivement. La conductibilité passe, elle aussi, par un minimum au voisinage du point neutre et comme ce minimum correspond chez les protéines à leur point isoélectrique, on l'explique de la même façon chez les Laminaires. Ce phénomène est considéré comme une nouvelle preuve de l'existence d'un point isoélectrique.

De l'ensemble de ces faits, ROBBINS admet l'existence d'un point isoélectrique chez les tissus végétaux et considère ces méthodes comme susceptibles de le mesurer.

En 1924, il applique la méthode des colorants à la détermination du point isoélectrique du mycélium de *Rhizopus nigricans* et de *Fusarium lycopersici*. Colorants utilisés : éosine, bleu de méthylène et safranine.

Il trouve que ces points isoélectriques sont respectivement à pH 5 (*Rhizopus*) et 5,5 (*Fusarium*).

D'autre part, il vérifie par cultures du *Rhizopus* sur milieux appro-

priés, que le poids des récoltes sur milieux liquides passe par un minimum à pH 5,2. Il en est de même pour le diamètre des colonies sur milieux gélosés.

L'hypothèse émise par ROBBINS donnait ainsi une explication générale de cette curieuse forme de certaines courbes de croissance.

Or des faits analogues étaient retrouvés, non seulement chez les Champignons, mais aussi chez les Bactéries et les Phanérogames.

Il faut d'abord signaler et mettre à part les expériences classiques de WINSLOW, FALK et CAULFIELD 1924 sur la cataphorèse d'une émulsion bactérienne.

Une suspension de bactéries soumise à l'action d'un courant électrique sous une différence de potentiel de 250 volts environ se comporte comme une suspension colloïdale ordinaire. Les bactéries se dirigent vers la cathode en milieu acide et vers l'anode en milieu alcalin. Quand on fait varier régulièrement la réaction de l'acidité vers l'alcalinité, on voit d'abord la vitesse de transport vers la cathode diminuer et, pour un certain pH, s'annuler. Puis le sens du courant se renverse et les bactéries se dirigent vers l'anode, avec une vitesse accrue jusqu'à pH 10, où la vitesse est maximum.

Les cellules bactériennes tuées, leurs spores, se comportent de même.

Le pH pour lequel le sens du transport se renverse définit le point isoélectrique de la suspension colloïdale. Les cellules bactériennes se comportent ici comme les supports inertes des champs électriques dont la nature et l'intensité dépendent de la réaction du liquide ambiant.

Mais ce phénomène n'a rien de commun avec le point isoélectrique des protéines cellulaires et avec les courbes de croissance de WEBB.

Celles-ci ont été retrouvées chez plusieurs bactéries. COHEN et CLARK en 1919 l'observent en eau peptonée pour le développement du *Bacillus dysenteriae* (var. Shiga). La zone de croissance optimum qui s'étend de pH 6 à pH 8 est marquée vers pH 7 par une dépression correspondant à un minimum.

Au contraire *B. coli*, *B. aerogenes*, *B. dysenteriae* Flexner, *B. proteus*, *B. bulgaricus*, présentent une zone optimum uniforme, sans dépression.

Chez les Phanérogames, le phénomène a d'abord été observé dans les essais de germination de graines placées dans des solutions de pH variés.

HIXON en 1920 fait germer des graines de Blé (froment), d'Avoine, de Pois, de Carotte dans des solutions nutritives ajustées par HCl ou

NaOH à pH 3, pH 4, pH 5, pH 6, et pH 7. Il note le pourcentage des germinations et détermine le poids des jeunes plantules à un stade déterminé. Sauf pour la Carotte, le pourcentage des germinations présente vers pH 5,5 un minimum compris entre 2 maximums. Le poids sec des racines, au 16^e jour, présente aussi un minimum pour les plantes développées vers pH 5,25.

L'auteur montre enfin que la réaction de tous les milieux de culture varie et que la valeur du pH converge vers un chiffre moyen. Il émet l'idée que ces faits sont peut-être en relation avec le point isoélectrique des protéines de la membrane cellulaire.

SALTER et MAC ILVAINE 1920 enregistrent des variations analogues, mais les attribuent à des contaminations bactériennes. Les bactéries auraient épuisé le milieu en nitrates.

ARRHÉNIUS 1922 étudie diverses plantes à ce point de vue, mais il s'agit de plantes déjà âgées poussant en pleine terre. Le critérium choisi est ici, soit le poids des racines ou des tiges, soit la surface de feuille (Trèfle, Blé, Orge, Radis, Coton). Les minimums de WEBB s'observent en des points divers de l'échelle des pH. Avec le *Medicago sativa* les maximums sont à pH 5 et pH 8.

L'auteur suppose que les deux maximums correspondent l'un à la concentration optimum des ions H, l'autre à la concentration optimum des ions OH, mais, comme le fait remarquer OLSEN, les conditions expérimentales d'ARRHÉNIUS sont peu précises et ses résultats méritent d'être contrôlés.

COLE prend comme critérium la longueur des racines de Blé, quand des semences germent dans des solutions tampons (phosphate + soude) (phthalate acide de potasse + soude). Le minimum serait à pH 6 environ.

LLOYD décrit des constatations identiques dans la germination des grains de pollen. La longueur des tubes polliniques varie avec la concentration en ions H. Dans la zone optimum, on observe une dépression donnant une courbe de même type que celles de WEBB.

LUNDEGÅRDH 1924 a mentionné les courbes à deux maximums de WEBB et de HOPKINS dans les germinations de Blé, mais il a pu mettre en évidence des faits très suggestifs sur l'action réciproque des ions H et des ions Ca. Nous aurons l'occasion d'y revenir.

Enfin OLSEN 1925, dans une série de travaux remarquables, a cherché avec grand soin l'influence de la réaction du sol sur les plantes, en se plaçant dans des conditions aussi semblables que possible aux conditions naturelles. Il n'a pu, dans aucun cas, retrouver les courbes de croissance à double maximum signalées par ARRHÉNIUS.

Les conditions opératoires suivies par ce dernier auteur soulèvent de nombreuses critiques, ce qui enlève, d'après OLSEN, toute valeur à ses résultats.

DENNY et YODEN ont repris en 1926 et 1927 la théorie de ROBBINS et l'ont soumise à une critique expérimentale sévère.

L'hypothèse de ROBBINS repose tout entière sur l'expérience suivante : quand des tranches de pomme de terre sont plongées dans des solutions tampons à pH variés, les solutions les plus acides sont alcalinisées, les solutions les plus alcalines sont acidifiées. Toutes tendent à prendre un pH moyen caractéristique pour la pomme de terre. Ces variations du pH en sens inverse sont dues, suivant ROBBINS, à la protéine du tissu qui se comporte comme un acide du côté alcalin, comme une base du côté acide, amenant ainsi les solutions tampons vers le pH caractéristique de la protéine. L'existence d'un point isoélectrique étant ainsi démontrée, les autres faits observés, minimum de gonflement, fixation des colorants, se rattacheront à la même cause.

Par contre la théorie de ROBBINS s'écroule si l'on démontre :

1° Que les changements de réactions ne s'effectuent pas suivant le schéma qu'il a indiqué ; 2° que ces changements ne sont pas dus à une protéine.

Ce sont ces deux démonstrations que DENNY et YODEN apportent dans leur travail. Les expériences ont porté sur des tranches de Pomme de terre, de Carotte, de Pomme, sur des semences entières de Maïs, de Seigle, de Blé que l'on faisait macérer dans des solutions salines dont la concentration variait de 0,1 N à 0,001 N. Il s'agissait soit de solutions simples : KCl, CaCl² et autres, soit de solutions balancées (phosphate, phtalate et borate).

Comme premier résultat, les auteurs n'ont pas retrouvé cette convergence de la réaction vers une valeur caractéristique pour la pomme de terre. Il y a toujours une acidification, mais dont l'intensité varie avec la nature du sel employé et spécialement avec la nature du cation. Ce n'est que dans le cas de solutions très diluées que le liquide externe prend une réaction caractéristique du tissu. Mais, dans ce cas, le pH obtenu est celui de l'extrait aqueux du tissu.

Comme deuxième résultat, les auteurs peuvent affirmer que les changements de réaction ne sont pas dus aux protéines du tissu. Ces changements se produisent quand les solutions salines sont additionnées de l'extrait aqueux du tissu. Ils se produisent encore avec les extraits aqueux préalablement bouillis, pour les débarrasser des protéines coagulables, et dialysés, pour les séparer des substances

colloïdales. L'extrait ainsi privé de toute substance protéique colloïdale et azotée se comporte comme le tissu lui-même.

Un tel extrait est formé principalement par des acides organiques en partie salifiés. Il est fortement acide et possède un certain pouvoir tampon.

Il est facile de concevoir qu'un tel extrait acidifiera généralement une solution saline, et, si cette dernière est assez diluée, le pH du mélange sera celui de l'extrait lui-même.

L'acidification observée dans les solutions de CaCl_2 est particulièrement intéressante. On l'explique très commodément. L'extrait du tissu est formé d'un mélange d'acides organiques et de leurs sels solubles. Ajouté à CaCl_2 , une partie des acides organiques est insolubilisée à l'état de sel de chaux. L'ionisation des acides restants est augmentée et le pH diminué.

En résumé, les modifications de la réaction observées quand on plonge un fragment de tissu dans une solution saline externe sont dues aux substances solubles non protéiques qui se dissolvent. Les protéines ne jouent aucun rôle dans ce phénomène qui ne peut donc servir à définir le point isoélectrique de ces tissus.

PEARSALL et EWING 1924 ont étudié par une méthode nouvelle la question du point isoélectrique des tissus végétaux. Quand on place un fragment de tissu végétal dans une solution saline dont le pH varie, on constate que les constituants du suc cellulaire, comme NaCl ou les pigments, diffusent plus ou moins vite suivant la réaction.

Ainsi pour des tubercules de Pomme de terre placés dans des solutions de NaCl de pH variés on constate une diffusion rapide de NaCl de l'intérieur vers l'extérieur pour $\text{pH} \leq 4,5$. De pH 4,5 à pH 5,2 on observe une augmentation de la teneur en Cl du tissu et enfin pour $\text{pH} > 5,2$ les pertes en NaCl réapparaissent.

Ces faits sont liés à une modification de la membrane plasmatique formée de protéines et de lipoïdes. Il est peu probable que le pH exerce une action sur les lipoïdes. Par contre, il peut modifier la protéine, en la précipitant, en provoquant la contraction du gel de protéine. Or il est remarquable de voir que la protéine principale et presque exclusive du tubercule de Pomme de terre, la légumine (qui est une globuline) a son point isoélectrique vers pH 4,3-4,4.

Avec la Carotte, l'augmentation brusque de la diffusion de NaCl se produit à pH 4,3-4,5 alors que le point isoélectrique de la globuline de la Carotte se place à pH 4,3 (d'après COHN, GROSSET, JOHNSON).

Avec le *Nitella*, dont le protoplasma aurait comme point isoélec-

trique pH 4,6, la diffusion brusque de NaCl, qui est le meilleur signe de l'injure infligée par les ions H, commence à pH 4,7.

Ces résultats fournissent en outre une méthode de détermination du point isoélectrique du protoplasma ou de la principale protéine du tissu, sans être obligé de l'extraire et de l'isoler. Ils placent la question des courbes à deux maximums de WEBB sur un nouveau terrain, la perméabilité cellulaire qui est réglée par les constituants protéiques de la membrane plasmatique.

Or on a déjà, sur cette question en pleine évolution, de nombreuses observations intéressantes, dont on trouvera un exposé dans le travail de MEVIUS.

Il semble que la perméabilité d'une membrane protéique s'accroît quand augmente la concentration des ions H. On a surtout observé, à cause sans doute des facilités d'expérimentation, la sortie des constituants cellulaires (en particulier NaCl), mais la perméabilité du dehors vers le dedans doit obéir aux mêmes lois. Cette perméabilité accrue permet la pénétration rapide des ions toxiques dans le protoplasme : ions H, ions des métaux lourds. Cela se traduit par une floculation du protoplasme que Miss RUTH ADDOMS a pu regarder à l'ultra-microscope sur les poils radicaux du Blé.

Du côté alcalin, la diminution de la concentration de l'ion H ou l'augmentation des ions OH (il est difficile de choisir) produirait un effet analogue. La question de la perméabilité cellulaire apparaît ainsi réglée par le pH.

On a enfin (MEVIUS) observé que l'ion Ca diminue dans tous les cas la perméabilité et se comporte à ce point de vue comme un antagoniste de l'ion H. On peut alors concevoir comme suit les courbes de WEBB. Le minimum correspond au minimum de perméabilité de la membrane plasmatique, c'est-à-dire au point isoélectrique de la protéine principale. En fait, le pH des tissus, réglé principalement par le suc vacuolaire, se trouve toujours dans une zone plus alcaline (une unité pH environ).

Quand la concentration de l'ion H croît dans le milieu extérieur, il peut d'abord atteindre le pH correspondant au point isoélectrique de la membrane plasmatique. A la perméabilité minimum ainsi réalisée doivent correspondre des échanges moins actifs et par suite une croissance ralentie.

Une nouvelle augmentation de la concentration des ions H provoque une brusque augmentation de perméabilité qui est d'abord favorable aux échanges nutritifs, d'où un maximum de développement. Mais si la concentration de H augmente trop, la perméabilité

peut devenir trop grande. Le protoplasme est bientôt coagulé, floculé par les ions toxiques.

Du côté alcalin, l'augmentation de la concentration des ions OH provoque d'abord les mêmes phénomènes, puis si l'alcalinisation est trop forte, apparaissent de très nombreuses causes d'intoxication dues aux ions OH.

Cette hypothèse qui fait jouer le principal rôle aux modifications de la perméabilité de la membrane apparaît comme très séduisante.

Hypothèse de Bach :

Les variations du pH peuvent s'exercer non seulement sur la cellule, mais aussi sur la composition du milieu nutritif. La concentration des ions H règle l'état physique des constituants du milieu et agit ainsi sur la croissance.

On sait que dans les sols calcaires, la chlorose des végétaux supérieurs est due à l'insolubilisation du fer par un pH trop élevé.

M. BACH a montré que la toxicité des acides gras à l'égard de l'*Aspergillus repens* était due à la fraction de ces acides à l'état moléculaire, et comme le degré d'ionisation d'un acide est fonction du pH, ce dernier contrôle en réalité cette toxicité. Ainsi la toxicité d'un milieu à base d'acétate d'ammoniaque dépend en réalité du pH. A la concentration N/10 et si le pH est voisin de 6, tout l'acétate est à l'état ionisé et constitue alors une excellente source d'azote pour le champignon. Le pH vient-il à baisser jusqu'à 5, l'ionisation de l'acétate diminue, la concentration de l'acide à l'état moléculaire augmente et peut prendre une valeur toxique. En fait la culture de l'*Aspergillus repens* est suspendue dans ces conditions à pH 5,2-5,4.

TETSU SAKAMURA, en appliquant cette méthode à la recherche de la valeur alimentaire de l'acide oxalique, a vu que cet acide est assimilable pour l'*Aspergillus niger*, seulement à l'état ionisé et qu'ici encore, pour une dose donnée, le rendement est en rapport avec le pH.

BACH, dans son travail sur la nutrition azotée de l'*Aspergillus repens*, a été amené à étudier les amino-acides et a retrouvé, à cette occasion, les courbes de WEBB. Mais il en propose une explication qui s'éloigne beaucoup de toutes celles que nous avons vues jusqu'ici.

Les amino-acides, comme tous les électrolytes, ne sont assimilés qu'à l'état d'ions ; comme d'autre part ils présentent un minimum de dissociation à leur point isoélectrique, il est logique d'admettre qu'ils présentent à ce moment une valeur alimentaire moindre. L'expérience lui a précisément montré que les minimums de crois-

sance obtenus en présence de glyocolle et d'asparagine correspondent aux points isoélectriques de ces amino-acides, c'est-à-dire à pH 6,2 pour le glyocolle, à pH 4,5 pour l'asparagine.

Les courbes de WEBB traduisent en somme des phénomènes complexes relevant soit de la perméabilité cellulaire, soit de la composition du milieu nutritif.

BACH dans son travail n'a abordé ce problème qu'incidemment. Il remarque d'ailleurs que sa méthode de travail était peu adaptée à ce genre d'expérimentation.

Il m'a proposé de reprendre ces recherches avec une technique appropriée. Ce sont elles qui constituent l'objet de notre travail.

LES MÉTHODES D'ÉTUDES

I. — LES ORGANISMES ÉTUDIÉS.

Nous avons effectué nos recherches à l'aide de six champignons de la famille des Mucorinées : *Mucor spinosus*, *Mucor circinelloïdes*, *Circinella spinosa*, *Absidia cærulea*, *Rhizopus nigricans* et *Cunninghamella echinulata* provenant tous de la mycothèque de la Faculté de Pharmacie de Paris.

Quelques expériences ont été faites avec le *Syncephalastrum cinereum*, mais l'exiguïté des conidies de cette espèce nous empêcha de continuer et d'en retenir les résultats.

Les organismes étaient repiqués sur bois de réglisse à des dates déterminées permettant un prélèvement des appareils reproducteurs douze jours après l'ensemencement. Le développement de ces cultures s'opérait à l'étuve à 24°.

Le *Mucor spinosus* VAN TIEGHEM, ainsi appelé en raison des prolongements épineux qui hérissent la columelle, avait été décrit antérieurement sous le nom de *Mucor plumbeus* par BONORDEN. Mais c'est la première terminologie qui prévaut en France et qui a été employée principalement par SCHRÖTER, SACCARDO, FISCHER, BAINIER et BEAUVERIE.

Sur milieu solide, le mycélium gris souris donne de très nombreux sporangiophores lisses et incolores, ayant environ 1 cm. de haut, irrégulièrement ramifiés (grappes ou sympodes) et se terminant par des sporanges brun chocolat.

Ces sporanges ont une membrane incrustée d'oxalate de chaux, diffluente à maturité en laissant une collerette à la base. La columelle libre est munie de spinescences irrégulières en nombre variable. Les spores sphériques, 5 à 8 μ , sont lisses le plus souvent, ou garnies de granules calcaires de la membrane du sporange, demeurées adhérentes aux spores périphériques. Zygosporos obtenues par BAINIER en 1884. Les Chlamydosporos se forment quand le mycélium est placé dans des conditions défavorables ; il peut aussi donner des cellules levures. Se trouve fréquemment sur le pain humide, le crotin de cheval, les excréments de souris et de lapin.

Le *Mucor circinelloides* VAN TIEGHEM ressemble macroscopiquement beaucoup au précédent, les sporangiophores sont peut-être plus nombreux, faisant paraître l'ensemble d'une couleur brun foncé. Ces sporangiophores sont circinés, groupés en cymes sympodiales et parfois assez courts pour donner l'illusion de sporanges sessiles. Les sporanges sont sphériques, plus petits que ceux du *Mucor spinosus*, 50 à 80 μ de diamètre, et possèdent une membrane diffluente seulement pour les plus gros, les autres étant caducs. Cette membrane est lisse et quelquefois laisse une collerette basilaire. La columelle, tantôt hémisphérique ou tantôt ovale, est libre et n'a pas de prolongements épineux. Les spores sont rondes ou elliptiques, 3 à 4 μ sur 5 à 6 μ , lisses, très légèrement grises. Les zygospores signalées comme couvertes de verrues très saillantes. Les chlamydospores, assez fréquentes, sont lisses et incolores. La forme levure est obtenue très facilement en milieux immergés. Espèce qui pousse bien sur tous les milieux et se rencontre très communément dans le sol.

Le *Circinella spinosa* VAN TIEGHEM et LE MONNIER a des caractères nettement différents des Mucors. Sporangiophores grêles, dressés et grimpants, formant un gazon gris foncé, atteignant 2 cm d'épaisseur. Les sporanges latéraux sont insérés sur deux lignes le long du sporangiophore principal. Ils sont portés par des sporangiophores secondaires, courts, circinés, qui se prolongent par une arête à la partie supérieure de la crosse. Cette spinescence peut manquer.

Ces sporanges secondaires sont petits, 60 μ de diamètre, brunâtres, à membrane non diffluente, se déchirant à l'équateur en laissant la partie basilaire sous forme d'une coupe.

Spores rondes, 4 μ de diamètre. Ce champignon se trouve sur les excréments d'homme, de chevaux et de rats (d'après FISCHER).

L'*Absidia cœrulea* BAINIER possède deux sortes de mycélium, l'un normal, immergé, et l'autre aérien ou rampant, formé de stolons qui, en contact avec le substratum, donne des rhizoïdes. De ces stolons aux entre-nœuds, partent les sporangiophores isolés, dressés et terminés par une apophyse infundibuliforme. Ils comportent également une cloison placée à 12 ou 24 μ du sommet. Les sporanges uniformes, 36 à 42 μ , sont violets au début, puis deviennent grisâtres et enfin bruns. La membrane est lisse, diffluente, laissant une collerette basilaire. Columelle mammiforme. Spores petites, 4 à 7 μ , lisses, violettes. Chlamydospores également lisses. Se rencontre dans la terre des bois.

Le *Rhizopus nigricans* EHRENBERG est d'une croissance très

rapide et si luxuriante qu'en peu de jours il envahit complètement le tube où il a été repiqué. Le mycélium présente, comme les *Absidia*, des stolons qui portent des rhizoïdes à chaque point de contact avec le substrat, mais les sporangiophores au lieu d'être insérés au milieu de l'arcade sont toujours localisés par groupes sur les nœuds, en face les rhizoïdes. Les entre-nœuds peuvent avoir de 1 à 3 cm. de long. Les sporangiophores sont le plus souvent réunis par 3 ou 5 et mesurent quelques millimètres de haut. Sporangies hémisphériques, avec columelle de même forme. Les sporangies sont blancs, puis deviennent noirs à maturité. Ils ont de 100 à 350 μ de diamètre. Spores inégales, irrégulières, arrondies ou ovales, anguleuses, striées de 9 à 12 μ de long sur 7 à 8 μ de large et grisâtres. Ne donne pas de chlamydospores. Se rencontre partout, il suffit d'abandonner un morceau de pain humide pendant quelques jours pour qu'il y apparaisse.

Le *Cunninghamella echinulata* THAXTER = *Cunninghamella africana* MATRUCHOT, fait partie des Mucorinées conidiophorées, la seule étudiée de ce groupe.

Le mycélium est blanchâtre, devient légèrement crème en vieillissant, peu épais, continu lorsqu'il est jeune et se cloisonnant plus tard. Il porte des rhizoïdes amincis et des conidiophores dressés, renflés en têtes, munis de conidies pédicellées, nombreuses, de 12 à 18 μ de diamètre, et garnies extérieurement d'aiguilles cristallines.

Chlamydospores sphériques.

Se trouve sur le crottin de chameau et de cheval.

II. — MILIEU DE CULTURE.

A. *Composition du milieu.* — Nous avons employé un milieu dont la constante minérale est empruntée à CZAPEK, mais elle fut modifiée de façon à obtenir des solutions à titre simple N/100 et N/500.

Phosphate monopotassique . . .	1 gr. 36	N/100
Chlorure de potassium	0 gr. 745	N/100
Sulfate de magnésie	0 gr. 492	N/500
Perchlorure de fer liquide	1 goutte.	
Sulfate de zinc	0 gr. 05	
Eau	1000 gr.	

La source d'hydrate de carbone était constituée par du glucose pur. L'emploi du saccharose n'a pas été envisagé, les Mucorinées ne produisant pas d'invertine capable de le dédoubler.

La substance azotée a été l'élément variable. Elle est généralement la cause de la variation de la concentration des ions H au cours de la culture. C'est elle également qui, dans l'hypothèse de BACH, doit être en partie responsable du minimum de croissance observé dans la zone optimum des pII. Par suite, nous avons opéré avec un représentant des divers groupements azotés susceptibles de servir d'aliment. On peut ainsi comparer l'influence des différentes fonctions azotées.

I. L'azote ammoniacal fut fourni par le succinate d'ammoniaque.

II. L'azote nitrique par le nitrate de soude.

III. L'azote aminé par les amino-acides : asparagine et glycocolle.

IV. L'azote peptidique par la peptone.

Tous ces composés étaient dissous à une concentration telle que le milieu était toujours N/10 en azote, sauf pour la peptone où la quantité employée était de 1 %.

Dans des essais préliminaires, certaines peptones ne répondirent pas à nos desiderata. Les unes se dissolvaient mal, d'autres précipitaient en milieu acide, à partir de pH 4,9. La peptone CHASSAING nous a donné toute satisfaction.

Le milieu ainsi constitué pouvait très bien convenir aux ensemencements, mais pour maintenir le pH invariable pendant la durée de l'expérience, il fallait y ajouter un sel à pouvoir tampon. En effet, sans cette précaution, les variations considérables qui se produisent rendent l'interprétation des phénomènes observés difficile.

Notre choix s'est porté sur le citrate de soude, car l'acide citrique, par ses trois fonctions acides, produit un effet tampon sur une zone très étendue. De plus, c'est un produit courant de la fermentation des sucres par les moisissures et qui paraît dénué de toxicité.

Primitivement, la teneur de ce sel dans les milieux était de 2 %, mais le pouvoir tampon conféré à ces solutions était trop grand. La quantité fut réduite à 1 %, dans la crainte également qu'une concentration trop considérable ne gênât le développement du mycélium.

Tous ces produits, de marque POULENC, furent recristallisés deux fois dans l'eau bidistillée. Cette eau provenait d'une distillation effectuée dans un appareil en verre, en présence de bichromate de potasse et d'acide sulfurique.

Pour éviter le déplacement des spores dans les gouttes pendantes et leur rassemblement au point le plus bas, nous avons essayé de rendre le liquide plus visqueux, en y ajoutant 10 % de gélatine. Cette modification changea le pouvoir tampon de la solution surtout du côté alcalin. De plus, les milieux dont le pH était inférieur à pH 2,8,

ce dernier compris, restaient liquides, tandis que les autres formaient une gelée consistante. Ce manque d'homogénéité nous empêcha d'avoir recours à ce procédé.

Nous dûmes aussi envisager la question de la tension superficielle du liquide, particulièrement avec le milieu au glycolle. Nous verrons ultérieurement comment, sans addition supplémentaire de sels, nous sommes arrivé à obtenir des gouttes pendantes bien distinctes et ne se modifiant pas au cours de l'expérience.

B. Détermination de la réaction des milieux et ajustage à des pH différents. — La réaction des milieux a été déterminée par la méthode colorimétrique de CLARK et LUBS, dont les indicateurs de la série des sulfones phtaléines fournissent de bons résultats. Ces opérations sont actuellement rentrées dans la pratique courante du laboratoire et il est inutile d'insister sur leur technique.

Cependant, signalons que pour avoir de bonnes déterminations, il est préférable de préparer les solutions étalons par petites quantités. Celles-ci doivent être conservées dans des flacons paraffinés pour éviter l'action de l'alcalinité du verre. Mentionnons d'autre part qu'elles jaunissent parfois, par suite du développement de moisissures, et dans ce cas il est nécessaire de les renouveler. Les échelles étalons étaient refaites tous les dix jours au minimum, surtout celle au rouge de méthyle, le plus altérable des colorants employés.

Le milieu une fois préparé, pour pouvoir l'ajuster commodément aux divers pH expérimentés, il convient d'en construire la courbe de neutralisation. Cette courbe nous permet de calculer les volumes de solutions titrées acides ou alcalines qu'il est nécessaire d'ajouter à un volume donné du milieu, pour l'amener à un pH quelconque.

Pratiquement, le milieu est préparé à concentration double et réparti dans des tubes à essais par fractions de 5 cc. A ces diverses fractions, on ajoute des quantités croissantes d'HCl N/5 ou de Na OH N/5 et on complète à 10 cc. avec l'eau distillée. On note alors le pH ainsi réalisé dans chaque cas. La courbe est construite en portant en abscisses les volumes des solutions acides ou alcalines utilisées, en ordonnées le pH obtenu.

Les opérations d'ajustage se font d'une façon similaire et également sur le milieu à concentration double.

L'acide chlorhydrique et la soude employés étaient titrés à N/5 et N/20 suivant les cas.

C. Préparation des milieux. — La solution à concentration double

était préparée, filtrée et répartie par 5 cc. dans des tubes à essais semblables à ceux utilisés pour les échelles colorimétriques. Ces tubes étaient réunis par petits groupes. Chaque groupe était ajusté au même pH. La quantité d'acide ou d'alcali, déterminée d'après la courbe, était ajoutée à l'aide de burettes graduées dans les différents tubes. Enfin le volume complété à 10 cc. avec de l'eau distillée.

Bouchés au coton cardé et capsulés, ils étaient alors stérilisés à 115° pendant 10'. Il suffisait, après un repos de 48 heures, de prendre le pH sur un tube de la série, pour avoir la réaction réelle du liquide.

Ce moyen de préparation fort simple ne peut s'appliquer dans tous les cas. Généralement la stérilisation par la chaleur modifie peu ou pas la réaction des liquides. Cependant dans les milieux alcalins, en particulier ceux qui renferment des sels ammoniacaux, il se produit une acidification importante qu'on peut expliquer en partie par une précipitation de phosphate ammoniaco-magnésien dont les cristaux apparaissent au fond du tube. A. BERTHELOT a déjà signalé des faits analogues.

Il est nécessaire aussi de tenir compte de la neutralisation progressive de l'alcali par l'acide carbonique de l'air.

Au bout d'un certain temps de conservation, le changement de réaction peut atteindre une unité pH. Un milieu à pH 8,2 a pu passer ainsi à pH. 7,1.

Pour éviter ces variations, l'ajustage des milieux alcalins a été pratiqué sur les milieux déjà stérilisés, à l'aide de solutions titrées stériles, quelques heures seulement avant l'emploi.

Pour le milieu au glyocolle, la précaution de n'ajouter les réactifs qu'après la stérilisation n'est pas suffisante. On remarque d'abord que le milieu se colore fortement à l'autoclave. Il passe au jaune foncé puis au brun, surtout dans les solutions plus alcalines que pH 6,2, les teintes étant d'autant plus prononcées que le pH du milieu est plus élevé. La réaction elle-même s'est d'ailleurs modifiée, il y a eu acidification, et cette variation est du même ordre de grandeur que celle du changement de teinte observé. En 1913, MAILLARD a étudié la réaction qui se produit à chaud entre le glucose et le glyocolle en milieu alcalin. D'après cet auteur il y aurait dégagement de CO_2 , provenant du carboxyle du glyocolle. La réaction commencée à température élevée se poursuivrait ensuite indéfiniment à la température ordinaire. A l'appui de cette thèse nous devons mentionner que les milieux à pH 5,3 et 5,8 presque imperceptiblement colorés au sortir de l'autoclave le devinrent avec le temps.

D'autre part cette réaction s'accompagne également d'une variation de déviation polarimétrique enregistrée par EULER et JOSEPHSON. Cette déviation serait fonction du temps et plus prononcée en milieu alcalin. Ainsi à pH 5,9, une différence de rotation de 0,55 % de la déviation primitive après 10 minutes d'expérience passe à 2,1 % après 540 minutes. A pH 8,1 après 750 minutes, elle est de 4,8 % et de 6,1 % à pH 8,4 après le même temps de contact des solutions. Enfin à pH 9,6 après 15 heures, elle atteint le chiffre de 32 %. Ils citent les travaux de KOSTYTSCHIEW et BRILLIANT qui prétendent que la réaction ne se produit qu'avec les glucoses (glucose, galactose et arabinose) et n'aurait pas lieu avec les holo-glucosides (saccharose, lactose). De plus la déviation polarimétrique serait moindre au point isoélectrique de l'acide-aminé, mais toujours plus forte du côté alcalin de ce point. Elle serait due à la réaction de la fonction aldéhydrique du sucre sur le groupement aminé, et ainsi, analogue à la réaction de Schiff. Quand on remplace l'acide-aminé par un phosphate, on n'observe aucune modification dans le pouvoir rotatoire du sucre.

Il serait sans doute intéressant de reprendre ces faits et d'étudier les changements de réaction et de composition qui surviennent dans les milieux à base d'acides aminés et d'hexoses, quand on les stérilise par la chaleur.

Il y aurait en particulier lieu de rechercher si le CO_2 ne viendrait pas aussi de l'oxydation du glucose en solution alcaline, avec production concomitante de CO , ainsi que l'a montré NICLOUX.

Quoi qu'il en soit, nous avons été obligé de stériliser les milieux et les solutions titrées par filtration à la bougie CHAMBERLAND et de les répartir aseptiquement au moyen de pipettes stériles, dans des tubes également stériles. La réaction n'ayant pas lieu à froid, aucun changement de réaction ni de coloration n'a été constaté au cours des manipulations. C'est aussi par ce procédé que les milieux à l'asparagine ont été préparés. La répartition dans les différents tubes a été simplifiée par le dispositif de BACH (5), permettant, avec le même appareil, de mesurer et de répartir aseptiquement les milieux stériles.

D. Ensemencement des milieux. — La germination des spores a été étudiée uniquement à l'aide des cellules de VAN TIEGHEM et LE MONNIER. Ces cellules sont constituées par des cylindres de verre fixés sur des lames, à l'aide de peinture émail, genre Ripolin. Elles sont mises à l'étuve quelques jours pour obtenir une dessiccation

complète du vernis et aussi pour en éliminer les dernières traces d'essence de térébenthine dont les vapeurs pourraient avoir une influence toxique. Elles sont en outre, avant chaque emploi, plongées quelques heures dans le mélange chromique ; méthode usuelle pour nettoyer tubes et pipettes, et en général toute la verrerie. Nous n'avons employé que des lamelles neuves passées en plus dans l'alcool avant l'usage. Ces lamelles, une fois chargées des gouttes pendantes, sont posées sur les anneaux enduits à leur partie supérieure d'huile de ricin suffisamment épaisse pour assurer une bonne fermeture et assez fluide pour permettre l'extension de l'air au moment de la mise à l'étuve.

Ce dispositif est certainement plus simple que ceux décrits par CLARK et par BEAUVERIE qui emploient respectivement la cire d'abeille, la vaseline et la paraffine. DUGGAR dispose même les cellules dans des boîtes de PÉTRI où elles sont maintenues par des disques de papier filtre percé de trous de la grandeur de l'anneau. A aucun moment nous n'avons constaté l'influence toxique des enduits.

Les expériences préliminaires ont montré qu'avec des cellules d'inégales grandeurs la germination, pour un même milieu, était variable et d'autant plus rapide que la cellule était plus grande, c'est-à-dire que le volume d'air englobé était plus considérable. Aussi nous sommes astreint à n'utiliser que des cellules de dimensions rigoureusement égales. Nos cellules avaient 16 mm. 7 de diamètre intérieur sur 9 mm. de hauteur, soit 1cc. 971 de capacité, et cette quantité d'air était non seulement suffisante pour la germination, mais également pour la production des sporanges.

Dans la méthode des gouttes pendantes en cellules de VAN TIEGHEM, on sait qu'il y a plusieurs écueils à éviter.

1° Il doit y avoir assez de liquide pour obtenir la saturation de l'atmosphère confinée sans que la goutte en expérience s'évapore ou subisse une concentration appréciable. On y arrive souvent en plaçant une goutte de liquide étudié, au fond de la cellule.

2° Dans ce cas, on doit s'attacher à maintenir la lame et la lamelle à la même température. En effet, si la lame est plus froide, il y a, d'après le principe de la paroi froide, condensation sur cette lame et distillation continue du haut vers le bas : les gouttes se dessèchent encore.

Si c'est la lamelle qui est la plus froide, il y a distillation du bas vers le haut : les gouttes se diluent et s'étalent.

Il est très difficile de réaliser, à tous les moments, l'équilibre thermique entre les deux faces de la cellule. Aussi ces phénomènes de

condensation accompagnent-ils presque toujours l'habitude de placer une goutte de liquide dans le bas de la cellule.

Il nous a paru préférable de supprimer cette pratique, et d'assurer la saturation de l'atmosphère interne en plaçant un grand nombre de gouttelettes sur la face inférieure de la lamelle.

Il ne peut y avoir dilution de ces gouttes par le liquide qui distille du bas vers le haut. Il y a très peu de chances de les voir distiller du haut vers le bas, car on n'a pas créé de centre de condensation à la partie inférieure.

Enfin, avantage non moins considérable, on peut opérer sur un très grand nombre de spores dans la même cellule.

Il faut néanmoins s'attacher à éviter les trop grandes différences de température entre les deux parois, surtout au sortir de l'étuve.

Pour cela, nous nous sommes bien trouvé de placer nos cellules dans des boîtes en carton, aussi bien pendant le séjour à l'étuve que sur la table du laboratoire au moment des examens.

L'ensemencement des gouttelettes peut être fait directement sur la lamelle avec le fil de platine ayant touché antérieurement la culture mère ; mais les résultats sont très irréguliers. En général les spores sont trop nombreuses pour permettre une numération. Il nous a semblé plus rationnel d'émulsionner au préalable les spores dans le milieu de culture lui-même et de répartir cette émulsion par gouttes sur les lamelles.

En fait, on préparait d'abord, dans l'eau distillée une émulsion mère de spores prélevées sur des cultures âgées de 12 jours, sur bois de réglisse.

On déterminait après dilution convenable la richesse en spores de cette émulsion. Ce titre connu, il suffisait de répartir dans la série des milieux à pH étagés, destinés à une expérience, le même nombre de gouttes de l'émulsion mère pour obtenir dans tous les cas des liquides renfermant à peu près le même nombre de spores.

En pratique, à 50 gouttes des divers milieux utilisés, on ajoutait 2 à 3 gouttes de l'émulsion mère ; ce qui ne pouvait modifier sensiblement la composition et la réaction de ces milieux.

On arrivait assez facilement par ce procédé à obtenir des liquides renfermant de 10 à 20 spores par goutte.

Les spores du *Rhizopus nigricans* et les conidies du *Cunninghamella echinulata* se mouillent difficilement par suite de leur enveloppe cireuse qui les protège ; mais on ne peut songer à l'addition d'un dissolvant de cette couche protectrice, qui pourrait agir comme antiseptique et modifier les résultats,

Pour déposer les gouttelettes sous les lamelles, certains auteurs ont préconisé une pipette coudée qui permet, par un simple jeu de bascule, de faire sourdre des gouttelettes de liquide à l'extrémité effilée. Cette pratique n'est pas à conseiller, le diamètre des gouttes obtenues n'étant pas uniforme.

Nous avons préféré l'emploi de l'anse de platine, qui a l'avantage d'être facilement stérilisable, de servir dans tous les cas, et de former des gouttes de mêmes dimensions dans toutes les expériences.

Cette technique nous a généralement donné toute satisfaction, cependant, dans le cas du glycocolle nous avons eu à vaincre des difficultés spéciales. Les gouttes ne tardaient pas à s'étaler irrégulièrement sans contours bien apparents. Ce phénomène inattendu ne pouvait guère s'expliquer que par une valeur différente de la tension superficielle dans les milieux au glycocollé, car tous les autres facteurs étaient rigoureusement identiques. Pour le vérifier, nous avons comparé le poids des gouttes des divers milieux, déposées sur les lamelles dans des conditions semblables. Les résultats sont les suivants :

Poids d'une cellule ayant reçu 16 gouttes de milieu :

Eau	9 gr.473 — 9 gr.471	soit 2 milligrammes pour 16 gouttes		
Peptone	9 gr.346 — 9 gr. 344	— 2	—	—
Glycocolle	10 gr.364 — 10 gr. 363	— 1	—	—
Glycocolle	9 gr.5875 — 9 gr. 587	— $\frac{1}{2}$	—	—

On sera peut-être surpris de relever les quantités infimes sur lesquelles les opérations ont été effectuées. Quoi qu'il en soit, les gouttes du milieu au glycocolle sont plus petites que celles des autres milieux, et comme tous les autres facteurs et notamment le diamètre du fil de platine sont analogues, ces faits paraissent bien réglés par une question de tension superficielle différente.

Le remède ne pouvait guère qu'être empirique. Après quelques tâtonnements, nous nous sommes arrêtés à la technique suivante.

Ordinairement, les cellules et les lamelles étaient maintenues par des pinces de DEBRAND, et flambées, sur le conseil de LANGERON, non pas à la flamme du bec Bunsen, mais à celle d'une lampe à alcool ; ce qui évite l'étalement du liquide. Cette fois, la lamelle flambée, on éteignait la lampe et on exposait quelques secondes la lamelle aux vapeurs qui se dégageaient de la mèche encore chaude. On procédait aussitôt à la répartition des gouttes, qui ne s'étaient généralement pas, mais il y avait encore quelques succès.

Sur le conseil de BACH, nous avons alors nettoyé nos lamelles non

plus avec de l'alcool pur, mais avec de l'alcool additionné de quelques gouttes d'huile de ricin. Dans ces conditions, une mince couche d'huile isolait les gouttelettes, et lesensemencements ultérieurs purent être continués à tous les pH. Nous avons opéré de même avec le milieu à l'asparagine.

Les avantages de cette méthode d'ensemencement sont nombreux:

1° Les gouttes déposées en grande quantité sur chaque lamelle évitent une dessiccation.

2° Celles-ci renferment un nombre de spores aussi constant que possible.

3° L'observation facilitée par le microscope à platine rectangulaire mobile munie d'un vernier à l'aide duquel les gouttes sont repérées, et les examens portent toujours sur les mêmes.

Cependant, malgré toutes les précautions ci-dessus énoncées : emploi d'émulsions de richesse identique, emploi du même fil de platine donnant des gouttes de grosseur analogue, le nombre des spores varie d'une goutte à une autre. Or il est facile de remarquer que la germination est d'autant plus rapide que le nombre des spores est plus grand.

Ainsi sur milieu au Nitrate de soude, ensemencé avec des spores de *Mucor spinosus*, nous relevons les chiffres suivants :

Heure	pH	Nombre de spores comptées dans deux gouttes voisines	Spores germées
13 ^e h.	3,5	27	1
		52	9
	4,1	8	1
		29	8
	4,3	13	1
		35	5
17 ^e h.	5,3	22	1
		45	17
	6,6	12	1
		25	15

Le *Mucor circinelloïdes*, sur milieu au succinate d'ammoniaque, fournit des exemples analogues :

Heure	pH	Nombre de spores comptées	Spores germées
13 ^e h.	5,1	11	2
		27	20
	5,3	19	1
		47	28

Les autres champignons sur les autres milieux donnent des chiffres identiques.

Quels que soient donc le milieu et sa réaction, la réunion d'un grand nombre de spores active la germination. D'où vient cet effet stimulant ?

Nous nous heurtons à la fameuse question du Bios, soulevée par WILDIERS en 1901, et qui eut son regain d'actualité avec les vitamines.

WILDIERS, reprenant les travaux de PASTEUR sur la culture de la levure sur un milieu chimiquement défini, observa que le développement ne se produisait pas dans tous les cas. La multiplication de la levure n'a lieu que lorsque l'ensemencement est fait avec un grand nombre de cellules. Or, disait-il, « si PASTEUR a réussi ses démonstrations, c'est qu'il ensemait très largement et apportait par là même un autre élément, méconnu mais indispensable, de nature chimique. Il est soluble dans l'eau, altéré à l'ébullition, passe à la dialyse et il l'appelle « Bios ».

Tel était l'état de la question quand KURONO, FUNK et DUBIN, FUNCK et FREEDMAN, DONALD et LECOQ identifient le Bios aux excitants fonctionnels, nommés vitamines. Pour les uns, l'effet provient de la vitamine hydro-soluble B seule ; pour les autres, c'est au contraire la vitamine D qui agit, certains prétendent que la vitamine D permet à la levure de synthétiser la vitamine B, enfin cette vitamine B pourrait se décomposer en trois facteurs : un facteur antinévritique, un facteur d'utilisation nutritive qui jouerait un rôle important dans le métabolisme des glucides, et un facteur thermostable et alcalinostable. Or les levures ne synthétiseraient les deux premiers que lorsqu'elles trouvent déjà le second dans le milieu nutritif.

FULMER, NELSON et SHERWOOD firent pousser par contre pendant deux ans une levure sur milieu comprenant ClNH_4 , Cl^2Ca , PO^4HK^3 , CO^4Ca , dextrine et sucre.

Nos expériences effectuées dans un but différent n'ont pas été faites avec les précautions qui sont indispensables à ce genre de recherches.

Mais il semble bien que pour les spores de moisissures, comme pour les cellules de levure, la germination sur milieux artificiels est plus rapide lorsque, toutes choses égales de par ailleurs, l'ensemencement est abondant. La germination est évidemment favorisée par une substance apportée par la semence ou fabriquée par elle.

III. — MÉTHODE D'EXAMEN DES GOUTTES PENDANTES.

Les expériences préliminaires ont montré qu'avec la grandeur des cellules utilisées, le début de la plupart des germinations a lieu 9 heures après l'ensemencement. Cependant, dans quelques cas, le développement a été plus précoce, et nous avons dû commencer nos observations à la 5^e heure.

Les solutions successives diffèrent entre elles de 4 dixièmes d'unité pH environ, de pH 2,2 à pH 9, soit 15 à 16 milieux pour chaque série ; et comme les expériences étaient faites en double, 30 à 36 cellules par expérience.

L'examen d'une cellule demandant environ 5 minutes, il fallait au total 3 heures pour l'observation complète d'une série. Si les ensemencements étaient effectués simultanément, les examens du début et de la fin n'étaient pas comparables, aussi avons nous été conduit à répartir nos ensemencements sur une durée de 3 heures environ. Pratiquement, après avoirensemencé les deux premières cellules à pH 2 par exemple, on attendait 10 minutes pour procéder à l'ensemencement des 2 cellules à pH 2,4 et ainsi de suite. Les examens étant ensuite effectués à la même cadence, il n'y avait aucune différence pratique entre les milieux examinés au début et ceux observés à la fin. Ces observations ont eu lieu dans tous les cas à la 9^e, 13^e, 17^e, 23^e et 36^e heure.

L'emploi de la platine à chariot a bien simplifié notre tâche, car une fois les gouttes soigneusement situées, il suffisait dans les examens ultérieurs de replacer le vernier dans les positions notées, pour retrouver les gouttes à coup sûr. Cette méthode avait l'avantage d'éliminer dès la première observation les gouttes mal formées ou ensemencées, soit avec un trop grand nombre de spores, soit au contraire avec un nombre trop faible.

Le dénombrement était facilité par l'usage d'un petit grossissement microscopique, qui permettait de voir toute l'étendue de la goutte dans le champ, sans déplacement de la platine. C'est la raison pour laquelle nous n'avons pu étudier le *Syncephalastrum* avec ses toutes petites conidies.

Pour les raisons exposées plus haut, nous n'avons retenu dans chaque cas que les gouttes renfermant un nombre moyen de 10 à 20 spores. Il en était ainsi pour la grande majorité des gouttes ; si bien que nos chiffres portent, pour chaque cellule, sur 150 à 200 spores environ.

Les conditions étaient donc presque identiques, et l'influence de ce facteur stimulant, appelé successivement Bios et Vitamine, était éliminé, contrairement à toutes les recherches tentées jusqu'à ce jour à ce sujet.

Les spores se gonflent au début et d'autant plus qu'elles se trouvent dans les milieux dont la réaction est favorable à la germination. Toutefois, il faut reconnaître (les mesures n'ayant cependant pas été pratiquées) qu'elles étaient toujours plus grosses du côté acide vers pH 4 environ. Leur volume peut devenir 4 à 5 fois plus considérable que celui observé au moment de l'ensemencement, exception faite bien entendu des cellules géantes. D'autre part, il semble qu'il y ait proportionnalité pour un même milieu entre le volume acquis et la grosseur primitive de la spore.

On considère comme spores germées celles qui ont émis un tube mycélien, et encore ne retient-on que les tubes dont la longueur égale environ la moitié du diamètre de la spore.

La part d'imprécision est à ce moment assez grande, car il est des cas où l'appréciation est difficile et faussée par l'ensemble. En effet, si une spore seule présente une petite protubérance, immédiatement elle attirera l'attention et paraîtra beaucoup plus avancée que ses voisines. Au contraire, si toutes les spores sont semblables, et à ce stade indécis, la détermination sera influencée par l'uniformité observée.

La méthode est bonne dans les premières heures ; son application est ensuite limitée par deux considérations : une mathématique, l'autre physiologique.

Quand le taux des germinations atteint 100 %, on ne peut rien tirer d'une observation plus prolongée.

D'autre part, les résultats reposent sur l'hypothèse que la composition des milieux, et notamment leur pH, varie peu ou pas au cours des examens. Cela est certainement exact au début, mais quand il s'est formé un développement mycélien déjà abondant, la composition chimique du milieu varie rapidement et la méthode perd de sa rigueur.

Les résultats numériques sont enregistrés dans les tableaux ci-joints. La première colonne indique les pH des divers milieux, la seconde le chiffre total des spores des deux cellules de la même réaction. Enfin dans les colonnes suivantes, le nombre de spores germées et le pourcentage aux différentes heures.

Dans un seul cas nous avons constaté une contamination bactérienne due au colibacille, provenant de la culture sur bois de réglisse.

Après plusieurs repiquages, la souche était de nouveau purifiée, et l'expérience fut refaite dans de bonnes conditions. On ne peut pas préciser quelle aurait été l'influence de ce parasite sur l'évolution du champignon ; le problème mériterait une étude détaillée. On peut penser notamment qu'une accélération du développement serait imputable à la production de vitamines par l'organisme bactérien associé.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

CHAPITRE PREMIER

UTILISATION DE L'ION NITRIQUE.

BACH (3) a montré que toutes les Mucorinées ne sont pas capables d'assimiler l'azote des nitrates. Sur des milieux dont le pH initial est voisin de 6,3-6,4 les *Rhizopus* et les *Absidia* ne donnent aucune culture.

Par contre, toutes les autres Mucorinées qu'il a étudiées fournissent un développement plus ou moins abondant.

Nous avons pu confirmer et préciser ces résultats. Parmi les espèces examinées : *Cunninghamella echinulata*, *Circinella spinosa*, *Mucor spinosus* et *Mucor circinelloides* germent normalement sur notre milieu nitraté. Mais l'*Absidia cærulea* ne donne à la 36^e heure qu'un pourcentage de germination insignifiant. Quant au *Rhizopus nigricans*, il ne se développe bien que dans la zone acide jusqu'à pH 5,7. Au delà, le pourcentage de germination, même à la 36^e heure, est très faible. Les cultures de BACH ayant été faites à pH 6,3-6,4, on s'explique les insuccès que cet auteur a obtenus. Il serait d'ailleurs intéressant de déterminer les raisons qui empêchent l'utilisation de l'azote nitrique, par cette espèce, en milieu neutre ou alcalin.

La vitesse de développement est très variable. Ainsi le *Cunninghamella echinulata* atteint le pourcentage extrême, c'est-à-dire 100 % à la 13^e heure, le *Circinella spinosa* à la 17^e heure et seulement en trois points, le *Mucor circinelloides* à la 23^e heure et enfin le *Mucor spinosus* à la 36^e heure.

Les limites de germination ont été déterminées dans tous les cas, tout au moins pour les premières observations, car avec le temps, elles s'étendent surtout du côté alcalin. En milieu acide, la germination cesse vers pH 3, sauf pour le *Circinella spinosa* qui s'arrête dès pH 4,3. Nous verrons d'autres faits qui soulignent la grande sensibilité de cette espèce à l'acidification. Dans la région alcaline, la

limite pour le *Cunninghamella echinulata* à la 9^e heure et le *Mucor circinelloïdes* à la 13^e heure est vers pH 9,5. Celle du *Circinella spinosa* s'étend beaucoup plus loin. Par contre celle du *Mucor spinosus* se trouve vers pH 8, à la 13^e heure.

L'existence dans toutes ces courbes d'un minimum compris entre deux maximums ne fait aucun doute. Tantôt il est représenté par une région plutôt que par un point, surtout dans les premières heures d'observation, et particulièrement pour le *Mucor circinelloïdes* où, à la 13^e heure, il s'étend de pH 4,5 à pH 6,5. Puis cette zone se resserre et se limite à pH 6,5 à la 17^e heure. C'est un fait général, et qui montre que notre méthode demande des observations précoces. Le *Mucor spinosus* donne aussi à la 13^e heure une zone de dépression entre pH 5 et pH 6,5 qui se resserre également vers pH 6,5 à la 17^e et 23^e heure. Tantôt au contraire il est limité, c'est le cas du *Cunninghamella echinulata* vers pH 6, et du *Circinella spinosa* vers pH 5.

Les maximums occupent aussi des positions variables dans l'échelle des pH. Ceux du *Cunninghamella echinulata* sont situés vers pH 5 et pH 7, ceux du *Mucor spinosus* vers pH 4 et pH 7, mais pour ces deux organismes, celui correspondant aux milieux les plus acides est plus élevé que l'autre. C'est l'inverse qui se présente avec le *Mucor circinelloïdes* et le *Circinella spinosa* où les maximums sont respectivement vers pH 4, pH 8 et pH 4,5; pH 6,5.

Au cours de notre travail, nous avons eu souvent l'occasion d'observer des cellules géantes. On sait que ces curieuses formations sont constituées par des cellules déformées, agrandies, à parois épaisses, et qu'elles n'apparaissent que dans les milieux acides, à partir d'un certain pH. En réalité dans les premières heures du développement, il est souvent difficile de décider si l'on a affaire à une cellule géante ou à une oïdiospore.

Les spores se gonflent démesurément sans autre manifestation étrangère, et restent dans cet état; d'autres fois, elles émettent des protubérances, mais de formes régulières, et ce n'est qu'avec le temps qu'elles se différencient des oïdies. Ou bien ces protubérances se transforment en filaments toruleux au début et normaux par la suite, vraisemblablement par changements de réaction du milieu qui s'alcalinise. Il n'y a qu'un seul point qui puisse les faire distinguer, c'est leur aspect granuleux.

De plus, les spores d'une même goutte se comportent souvent différemment. En général vers pH 3,1, les unes conservent les mêmes dimensions qu'au moment de l'ensemencement, les autres se gonflent sans toutefois bourgeonner, l'influence néfaste des ions H est évi-

dente. Au pH immédiatement supérieur, ces spores géantes donnent de gros filaments courts, toruleux et granuleux, qui sont un peu plus longs dans le milieu à pH plus élevé. Plus tard ils sont droits, non ramifiés, lisses, et atteignent directement le bord de la goutte, dénotant ainsi une vitalité exceptionnelle, dans la région favorable.

Vers le minimum, les filaments sont plus courts et peut-être moins gros, et font place aux oïdies pour le *Mucor circinelloïdes* et *spinosus* plus aptes que les autres organismes à cette particularité.

Dans les milieux alcalins, le mycélium se ramifie plus rapidement. La formation des sporanges suit un cours analogue. Les chlamydospores apparaissent quand le milieu est épuisé, et quelquefois naissent à l'extrémité des filaments.

Mucor spinosus sur Nitrate de soude.

pH	Spores comptées	13 ^e heure		17 ^e heure		23 ^e heure	
		Spores germées	%	Spores germées	%	Spores germées	%
2,2	201	0	0	0	0	0	0
2,6	204	0	0	0	0	0	0
3,1	305	0	0	6	1,9	21	6,8
3,5	353	35	9,9	230	65,1	339	96,0
4,1	237	50	21,0	175	73,8	228	96,2
4,3	214	26	12,1	142	66,3	196	91,5
4,6	268	24	8,9	140	52,2	214	79,8
4,9	244	33	13,5	182	74,5	217	88,9
5,3	201	17	8,4	82	40,7	176	87,5
5,8	218	24	11,0	124	56,8	200	91,7
6,2	266	9	3,3	45	16,9	103	38,7
6,6	166	2	1,2	33	19,8	72	43,3
6,9	213	38	17,8	115	53,9	197	92,4
7,2	228	12	5,2	34	14,9	103	45,1

Mucor circinelloïdes sur Nitrate de soude.

pH	Spores comptées	9 ^e heure		13 ^e heure		17 ^e heure		23 ^e heure	
		Spores ger- mées	%	Spores ger- mées	%	Spores ger- mées	%	Spores ger- mées	%
2,2	118	0	0	0	0	0	0	0	0
2,6	105	0	0	0	0	0	0	0	0
3,1	162	0	0	0	0	0	0	0	0
3,5	122	0	0	11	9,0	61	50,0	113	92,7
4,1	180	2	1,1	80	44,4	157	87,2	180	100
4,3	125	2	1,6	38	30,4	75	60,0	125	100
4,6	116	0	0	1	0,8	62	53,4	116	100
4,9	147	0	0	0	0	82	55,7	115	78,3
5,3	121	0	0	0	0	38	31,4	121	100
5,8	167	0	0	3	1,7	50	29,9	153	91,7
6,2	147	0	0	1	6,8	33	22,4	98	66,6
6,6	139	0	0	10	0,7	14	10,0	113	81,3
6,9	157	0	0	2	1,2	17	10,8	79	50,3
7,1	133	4	3,0	44	33,0	98	73,6	116	87,2
7,5	127	0	0	7	5,5	34	26,7	82	64,5
7,7	121	3	2,4	59	48,7	101	83,6	121	100
9,4	174	7	4,0	80	45,9	160	91,9	174	100
9,8	109	0	0	0	0	0	0	1	0,5

Cunninghamella echinulata sur Nitrate de soude.

pH	Spores comptées	9 ^e heure		13 ^e heure			
		Spores germées	%	Spores germées	%		
2,2	67	0	0	0	0		
2,6	62	0	0	0	0		
3,1	102	6	5,8	36	35,2		
3,5	121	18	14,8	117	96,6		
4,1	181	112	61,8	181	100		
4,3	149	122	81,8	149	100		
4,6	122	88	72,1	116	95,0		
4,9	117	115	98,2	117	100		
5,3	111	98	88,2	111	100		
5,8	137	63	45,9	94	68,6		
6,2	132	41	31,0	97	73,4		
6,6	224	127	56,6	224	100		
6,9	130	79	60,7	129	99,2		
7,1	102	71	69,6	96	94,1		
7,5	138	83	60,1	133	96,3		
7,7	130	35	26,9	58	44,6		
9,4	116	34	29,3	80	68,9		
9,8	103	0	0	9	8,7		

Circinella spinosa sur Nitrate de soude.

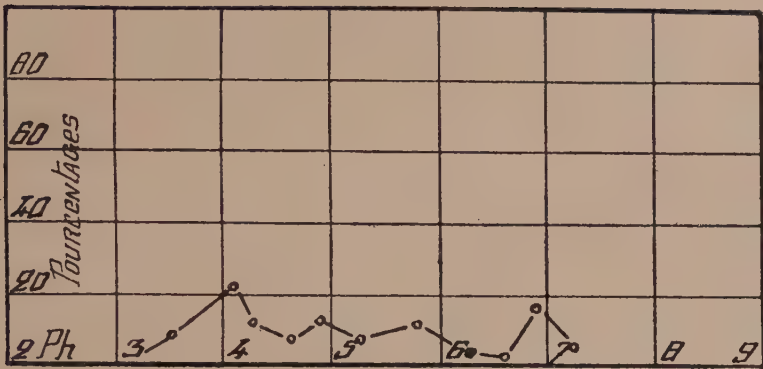
pH	Spores comptées	9 ^e heure		13 ^e heure		17 ^e heure	
		Spores germées	%	Spores germées	%	Spores germées	%
2,2	98	0	0	0	0	0	0
2,6	103	0	0	0	0	0	0
3,1	94	0	0	0	0	0	0
3,5	108	0	0	0	0	0	0
4,1	144	0	0	0	0	0	0
4,3	107	0	0	16	14,9	62	57,9
4,6	147	19	12,9	129	87,9	147	100
4,9	102	0	0	0	0	13	12,7
5,3	119	13	10,9	52	43,6	81	68
5,8	123	0	0	3	2,4	74	60,1
6,2	107	31	28,9	101	94,5	107	100
6,6	116	23	19,8	87	75,0	109	93,9
6,9	118	35	29,6	99	83,9	118	100
7,1	102	0	0	1	0,98	48	47,0
7,5	134	2	1,5	18	13,4	46	34,3
7,7	122	0	0	46	37,6	62	50,8
9,4	99	0	0	50	50,5	92	92,9
9,8	119	0	0	34	28,5	114	95,7

Absidia cœrulea sur Nitrate de soude

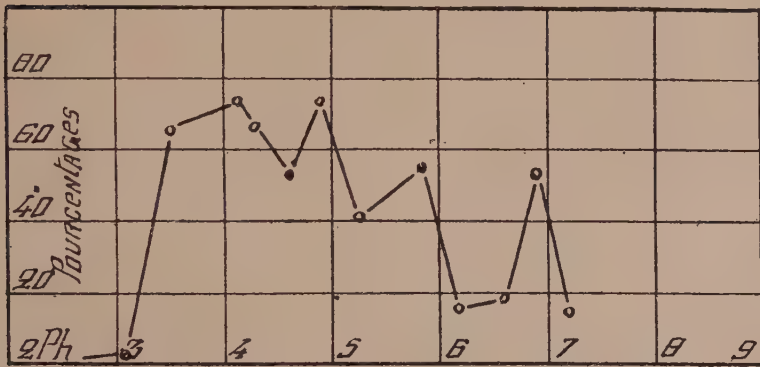
pH	Spores comptées	17 ^e heure		23 ^e heure		36 ^e heure	
		Spores germées	%	Spores germées	%	Spores germées	%
2,2	257	0	0	0	0	0	0
2,6	269	0	0	0	0	0	0
3,1	434	0	0	0	0	0	0
3,5	342	0	0	0	0	0	0
4,1	381	0	0	5	1,3	8	2,0
4,3	595	0	0	1	0,1	5	0,8
4,6	458	0	0	1	0,2	3	0,6
4,9	304	0	0	1	0,3	4	1,3
5,3	380	0	0	2	0,5	3	0,7
5,8	427	0	0	2	0,4	14	3,2
6,2	565	7	1,2	35	6,1	57	10,0
6,6	429	3	0,6	36	8,3	64	14,9
6,9	523	10	1,9	28	5,3	65	12,4
7,1	436	1	0,2	14	3,2	33	7,5
7,5	193	0	0	2	1,0	12	6,2
7,7	448	0	0	16	3,5	15	7,0
9,4	177	0	0	8	4,5	19	10,7
9,8	366	0	0	0	0	18	4,9

Rhizopus nigricans sur Nitrate de soude

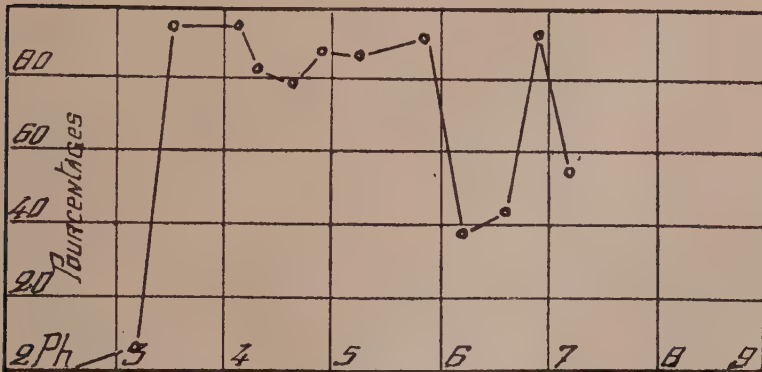
pH	Spores comptées	13 ^e heure		17 ^e heure		23 ^e heure	
		Spores germées	%	Spores germées	%	Spores germées	%
2,2	184	0	0	0	0	0	0
2,6	145	0	0	0	0	0	0
3,1	106	0	0	26	24,5	78	73,5
3,5	441	94	21,3	316	71,6	441	100
4,1	304	44	14,4	267	87,8	303	100
4,3	158	24	15,1	150	94,9	158	100
4,6	274	91	33,2	267	97,4	274	100
4,9	310	50	16,1	231	74,5	310	100
5,3	199	0	0	26	13,0	162	81,4
5,8	273	20	7,3	134	49,0	264	96,7
6,2	360	0	0	71	19,7	184	51,1
6,6	—	—	—	—	—	—	—
6,9	152	0	0	0	0	6	3,9
7,1	176	0	0	28	15,9	128	72,7
7,5	254	0	0	12	4,7	165	64,9
7,7	169	0	0	2	1,1	20	11,8
9,4	131	0	0	7	5,3	37	28,2
9,8	132	0	0	0	0	0	0



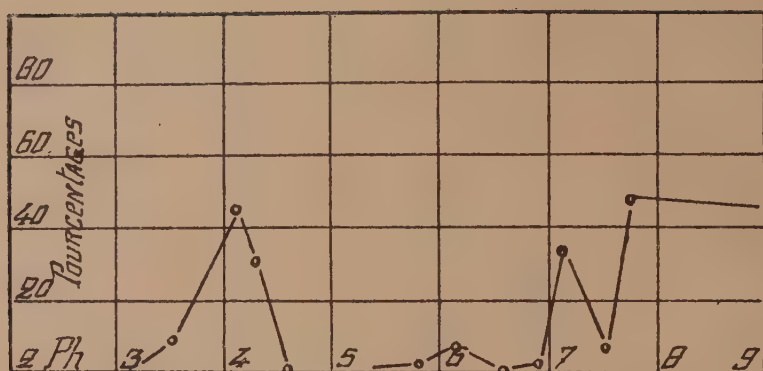
Mucor spinosus sur Nitrate de soude à la 13^e heure.



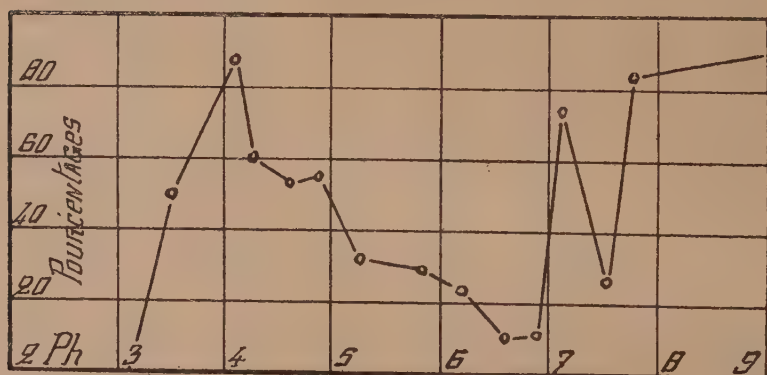
Mucor spinosus sur Nitrate de soude à la 17^e heure.



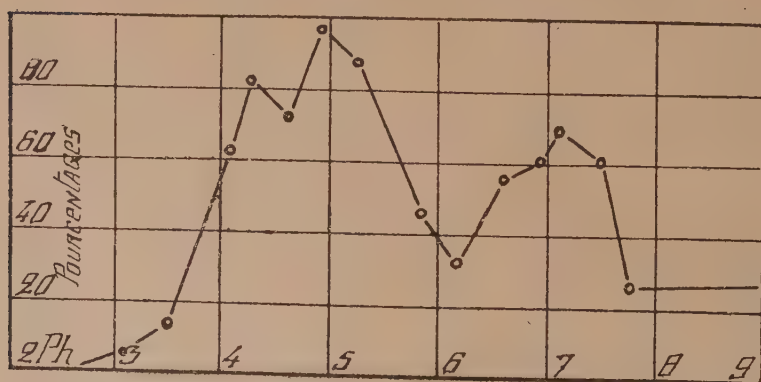
Mucor spinosus sur Nitrate de soude à la 23^e heure.



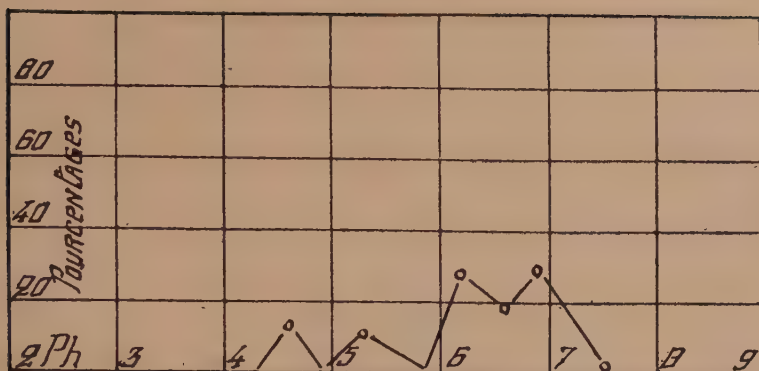
Mucor circinelloides sur Nitrate de soude à la 13^e heure.



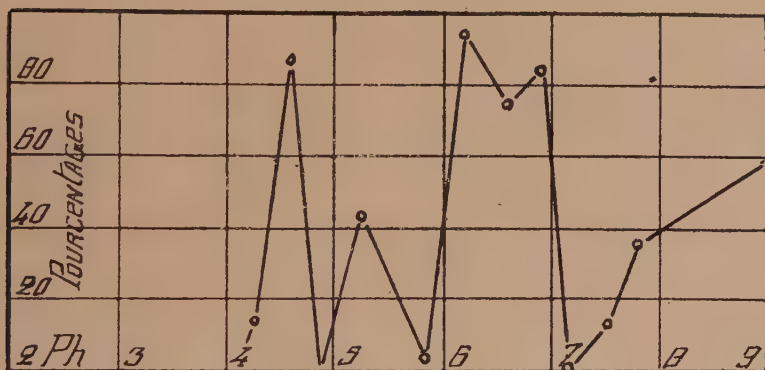
Mucor circinelloides sur Nitrate de soude à la 17^e heure.



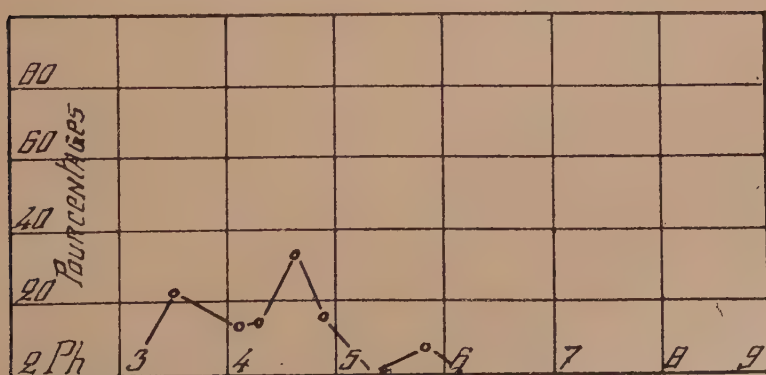
Cunninghamella echinulata sur Nitrate de soude à la 9^e heure.



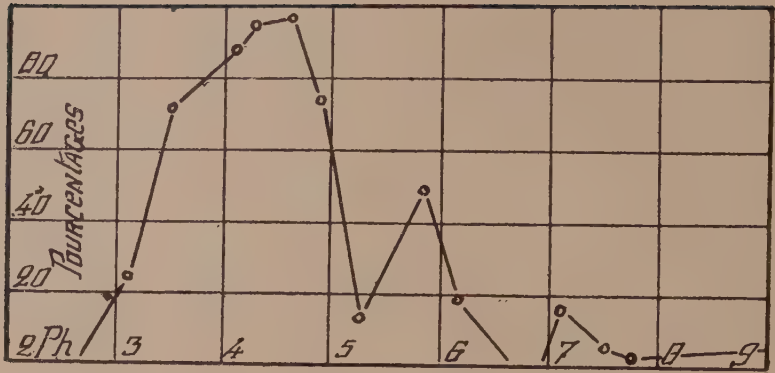
Circinella spinosa sur Nitrate de soude à la 9^e heure.



Circinella spinosa sur Nitrate de soude à la 13^e heure.



Rhizopus nigricans sur Nitrate de soude à la 13^e heure.



Rhizopus nigricans sur Nitrate de soude à la 17^e heure.

CHAPITRE DEUXIÈME

UTILISATION DE L'ION AMMONIACAL.

Le succinate d'ammoniaque a été choisi comme type de sel ammoniacal. Un acide organique est préférable aux acides minéraux, à cause de son pouvoir tampon. D'autre part, la molécule non dissociée, n'a pas, comme dans le cas des acides gras de la série acétique, une action toxique propre, troublant les phénomènes observés.

L'azote ammoniacal semble convenir à toutes les espèces ; cependant on peut encore établir une classification d'après la vitesse de germination.

Le *Circinella spinosa* et le *Cunninghamella echinulata* sont, ici aussi, ceux qui germent le plus rapidement. Puis suivent le *Rhizopus nigricans*, le *Mucor circinelloïdes*, l'*Absidia cærulea* et le *Mucor spinosus*.

Dans l'ensemble le développement est supérieur au précédent, exception faite pour le *Mucor spinosus*. Le maximum atteint par ce dernier est de 58,2 % à la 23^e heure. Le *Circinella spinosa* est favorablement influencé, il atteint le pourcentage de 100 à la 13^e heure. Le *Cunninghamella echinulata* n'y arrive qu'à la 17^e heure ainsi, d'ailleurs, que le *Rhizopus nigricans*. Le *Mucor circinelloïdes* y est à la 23^e heure et l'*Absidia* à la 36^e heure.

Les limites de germination du côté acide sont toutes à pH 3,5 à la 23^e heure, sauf pour l'*Absidia*, où le développement s'arrête à pH 4,5. Du côté alcalin la limite n'a pas été atteinte, toutes les espèces germent encore à pH 8.

Il ne faut pas oublier, que les nombreuses causes d'acidification des milieux alcalins, apportent ici une complication particulière, rendant difficile la détermination de la limite extrême de germination.

Cette fois encore, les courbes montrent un minimum pour chacune d'elles, mais, par suite du développement rapide, il disparaît et s'efface complètement pour le *Cunninghamella echinulata* et le *Rhizopus nigricans* dès la 17^e heure. Il est situé, entre pH 5 et pH 6, pour les deux espèces précitées et le *Mucor spinosus*, et entre pH 6 et pH 7, pour les trois autres.

Le 1^{er} maximum est à pH 4,5 pour le *Cunninghamella echinulata*, à pH 5 pour le *Rhizopus nigricans*, vers pH 5,5 pour les autres.

Le 2^e maximum est beaucoup plus variable. Il est à pH 5,5 pour le *Cunninghamella echinulata*, à pH 6,5 pour le *Rhizopus nigricans*, à pH 7 pour le *Mucor spinosus*, à pH 7,5 pour le *Mucor circinelloides* et l'*Absidia* et à pH 8 pour le *Circinella spinosa*.

L'observation des cellules géantes est plus facile avec le succinate d'ammoniaque qui est un aliment physiologiquement acide. C'est la raison pour laquelle on a pu les noter dès pH 5,3 avec le *Mucor spinosus* ; à pH 3,6 avec le *Mucor circinelloides*, mais cet organisme donne surtout des oïdies, au dépens des filaments presque inexistants. Le *Rhizopus nigricans* présente un exemple typique des transformations du mycélium qui à pH 3,6 est formé uniquement de cellules géantes rassemblées en une masse compacte ; à pH 4,1 les hyphes de normales qu'elles étaient, deviennent toruleuses, et des protubérances apparaissent sur le côté des filaments. Enfin à pH 5,1 ces particularités ne sont qu'exceptionnelles. C'est encore dans les mêmes limites qu'il faut les signaler pour les autres champignons sauf pour l'*Absidia* où on les trouve de pH 4,7 à 5,3.

Mucor spinosus sur Succinate d'ammoniaque.

pH	Spores comptées	13 ^e heure		17 ^e heure		23 ^e heure	
		Spores germées	%	Spores germées	%	Spores germées	%
1,8	135	0	0	0	0	0	0
2,1	157	0	0	0	0	0	0
2,6	144	0	0	0	0	0	0
3,6	133	0	0	3	2,2	12	9,0
4,1	136	5	3,6	10	7,3	32	23,5
4,7	138	0	0	5	3,6	22	15,9
5,1	136	0	0	18	13,2	55	40,4
5,3	132	1	0,7	20	15,1	71	53,7
5,8	168	0	0	14	8,3	44	27,4
6,3	180	2	1,1	18	10,0	90	50,0
6,8	105	1	0,9	17	16,1	44	41,9
7,1	134	10	7,4	41	30,5	78	58,2
7,5	178	5	2,8	29	16,2	93	52,2
7,7	115	1	0,8	17	14,7	54	46,9
8,3	123	2	1,6	16	13,0	44	35,7

Absidia cœrulea sur Succinate d'ammoniaque.

pH	Spores comptées	13 ^e heure		17 ^e heure		23 ^e heure		36 ^e heure	
		Spores ger- mées	%	Spores ger- mées	%	Spores ger- mées	%	Spores ger- mées	%
1,8	161	0	0	0	0	0	0	0	0
2,1	173	0	0	0	0	0	0	0	0
2,6	154	0	0	0	0	0	0	0	0
3,6	149	0	0	0	0	0	0	0	0
4,1	177	0	0	0	0	0	0	0	0
4,7	262	2	0,7	5	1,9	7	2,6	35	13,3
5,1	155	10	6,4	19	12,2	39	25,1	66	42,5
5,3	151	2	1,3	16	10,5	21	13,9	49	32,4
5,8	105	5	4,7	36	34,2	60	57,1	105	100
6,3	158	9	5,6	34	21,5	86	54,4	158	100
6,8	401	30	7,4	118	29,4	235	58,6	273	68,1
7,1	253	16	6,3	83	32,7	176	69,5	182	72,0
7,5	218	21	9,6	152	69,7	209	95,8	218	100
7,7	215	12	5,5	94	43,7	200	93,0	215	100
8,3	113	24	21,2	74	65,4	108	95,5	113	100

Rhizopus nigricans sur Succinate d'ammoniaque

pH	Spores comptées	9 ^e heure		13 ^e heure		17 ^e heure	
		Spores germées	%	Spores germées	%	Spores germées	%
1,8	304	0	0	0	0	0	0
2,1	267	0	0	0	0	0	0
2,6	235	0	0	0	0	0	0
3,6	310	0	0	0	0	19	6,1
4,1	494	0	0	0	0	30	6,0
4,7	455	0	0	14	3,0	315	69,2
5,1	478	2	0,4	280	58,5	478	100
5,3	333	0	0	160	48,0	333	100
5,8	380	0	0	190	50,0	380	100
6,3	585	3	0,5	516	88,2	585	100
6,8	372	2	0,5	334	89,7	372	100
7,1	436	1	0,2	216	49,5	436	100
7,5	414	2	0,4	299	72,2	414	100
7,7	356	0	0	45	12,6	352	98,9
8,3	152	0	0	5	3,2	136	89,5

Mucor circinelloides sur Succinate d'ammoniaque.

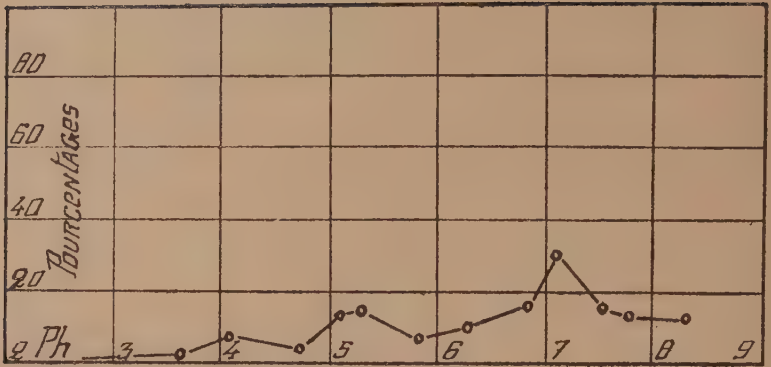
pH	Spores comptées	9 ^e heure		13 ^e heure		17 ^e heure	
		Spores germées	%	Spores germées	%	Spores germées	%
1,8	169	0	0	0	0	0	0
2,1	156	0	0	0	0	0	0
2,6	150	0	0	0	0	0	0
3,6	238	0	0	0	0	19	7,0
4,1	185	0	0	6	3,2	29	15,6
4,7	254	5	1,96	35	13,7	188	74,0
5,1	227	5	2,2	56	24,6	191	84,1
5,3	224	7	3,1	89	39,7	211	94,1
5,8	262	13	4,9	92	35,1	249	95,0
6,3	181	10	5,5	82	45,3	170	93,9
6,8	151	0	0	22	14,5	107	70,8
7,1	232	13	5,6	84	36,2	214	92,2
7,5	147	7	4,7	59	40,1	118	80,2
7,7	186	7	3,7	46	24,7	177	95,1
8,3	244	0	0	26	10,6	226	92,6

Cunninghamella echinulata sur Succinate d'ammoniaque.

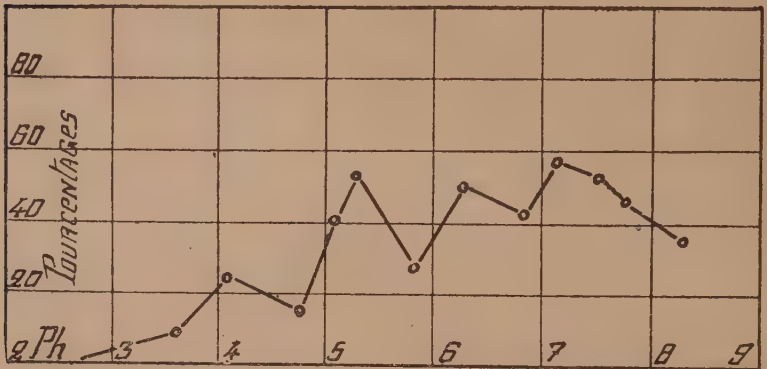
pH	Spores comptées	9 ^e heure		13 ^e heure		17 ^e heure	
		Spores germées	%	Spores germées	%	Spores germées	%
1,8	105	0	0	0	0	0	0
2,1	118	0	0	0	0	0	0
2,6	122	0	0	0	0	0	0
3,6	188	0	0	0	0	0	0
4,1	139	9	6,4	35	25,1	75	53,9
4,7	120	102	85,0	117	97,5	120	100
5,1	116	25	21,5	82	70,6	107	92,3
5,3	88	80	90,9	86	97,6	88	100
5,8	117	80	68,4	102	87,1	114	97,5
6,3	106	13	12,2	80	75,4	96	90,5
6,8	134	0	0	0	0	0	0
7,1	107	0	0	40	37,3	52	48,5
7,5	94	0	0	0	0	0	0
7,7	155	0	0	18	11,6	41	26,4
8,3	93	0	0	26	27,9	42	45,1

Circinella spinosa sur Succinate d'ammoniaque.

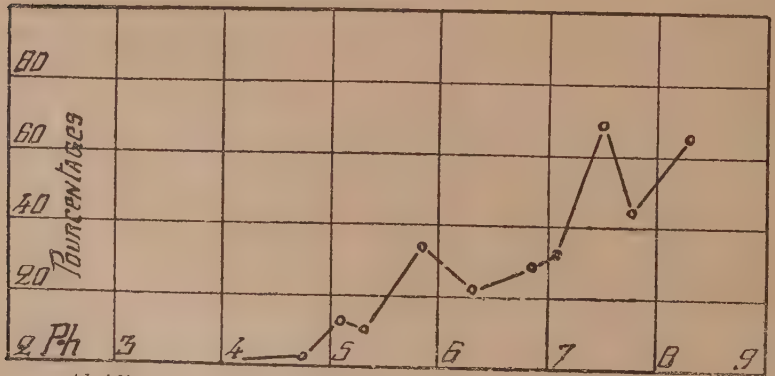
pH	Spores comptées	9 ^e heure		13 ^e heure		17 ^e heure	
		Spores germées	%	Spores germées	%	Spores germées	%
1,8	101	0	0	0	0	0	0
2,1	112	0	0	0	0	0	0
2,6	92	0	0	0	0	0	0
3,6	107	0	0	0	0	0	0
4,1	118	0	0	0	0	9	7,6
4,7	123	2	1,6	56	45,5	107	26,9
5,1	96	51	53,1	89	92,7	96	100
5,3	109	68	62,3	105	96,3	109	100
5,8	106	70	66,0	106	100	106	100
6,3	184	18	9,7	158	85,8	184	100
6,8	105	32	30,2	50	47,6	95	90,4
7,1	111	80	72,0	106	95,4	111	100
7,5	116	18	15,5	102	87,9	116	100
7,7	115	40	34,7	112	97,4	115	100
8,3	120	77	64,1	120	100	120	100



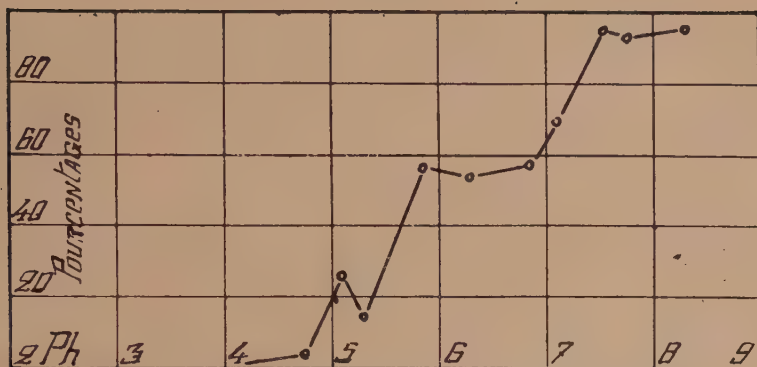
Mucor spinosus sur Succinate d'ammoniaque à la 17^e heure.



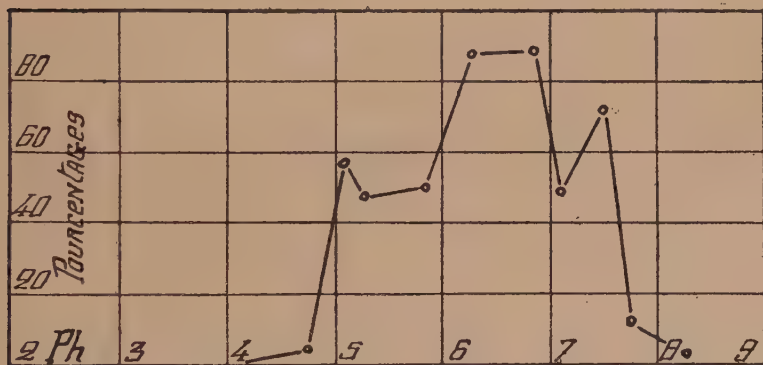
Mucor spinosus sur Succinate d'ammoniaque à la 23^e heure.



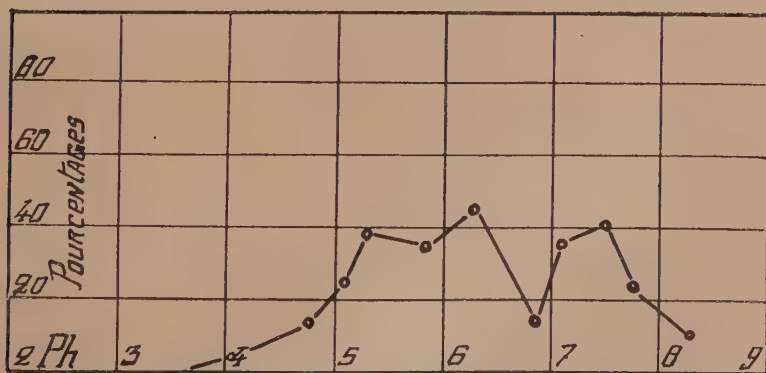
Absidia cœrulea sur Succinate d'ammoniaque à la 17^e heure.



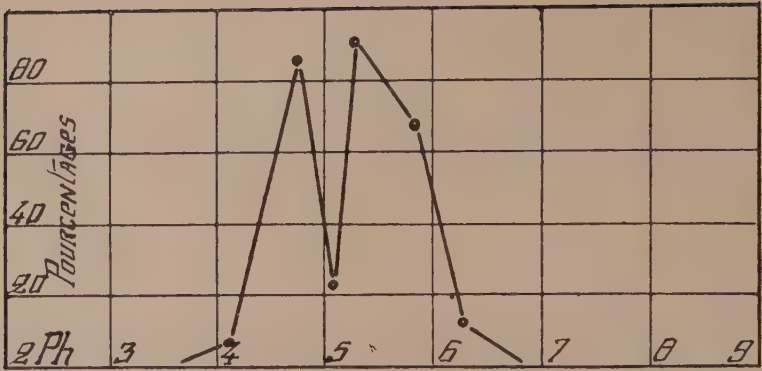
Absidia coerulescens sur Succinate d'ammoniaque à la 23^e heure.



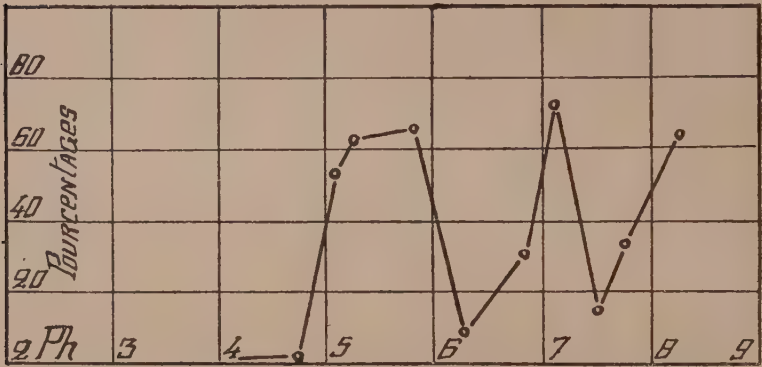
Rhizopus nigricans sur Succinate d'ammoniaque à la 13^e heure.



Mucor circinelloides sur Succinate d'ammoniaque à la 13^e heure.



Cunninghamella echinulata sur Succinate d'ammoniaque à la 9^e heure.



Circinella spinosa sur Succinate d'ammoniaque à la 9^e heure.

CHAPITRE TROISIÈME

UTILISATION DE L'AZOTE DES AMINO-ACIDES

Comme 3^e type de source d'azote nous étudierons deux amino-acides : le glycocolle et l'asparagine.

Ces corps présentent pour nous un intérêt capital, puisqu'ils possèdent un point isoélectrique. Il s'agit donc de vérifier si les minimums de développement coïncident avec le point isoélectrique, ainsi que l'a constaté BACH (1). Mais sa méthode, comme il l'a reconnu lui-même, n'était pas adaptée à l'étude de ce phénomène.

Or qu'est-ce en fait que le point isoélectrique ?

La notion de point isoélectrique a été introduite dans la science par HARDY.

Voici son expérience fondamentale. Quand une suspension colloïdale d'ovo-albumine coagulée est soumise à l'action d'un courant électrique, on constate le déplacement des micelles colloïdales par le courant. Le sens du transport, varie avec la nature de la charge électrique de la micelle. Les colloïdes à charge positive sont transportés au pôle négatif ; les colloïdes à charge négative au contraire se rendent au pôle positif.

Or, si l'on fait varier d'une façon continue la réaction de la phase liquide, de l'acidité forte vers l'alcalinité, par exemple, on remarque, que la charge de la micelle diminue progressivement, et, à un moment donné, s'annule, puis elle prend une charge de sens contraire. On constate simultanément que la vitesse de transport diminue, puis s'annule, au moment où la charge électrique change de signe, puis le transport reprend en sens inverse.

On appelle point isoélectrique, la concentration en ions hydrogène pour laquelle se produit ce changement dans la charge et dans le sens du transport. On l'exprime actuellement en unités pH.

On a constaté que toutes les solutions colloïdales possédaient un point isoélectrique. De plus, on a observé dans le cas des protéines, que toutes leurs propriétés physiques : solubilité, viscosité, gonflement, etc... passent à ce moment par un minimum.

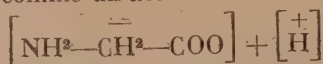
La définition même du point isoélectrique par l'expérience de HARDY montre que ces substances possédant une charge électrique, différente de part et d'autre de leur point isoélectrique, doivent se

comporter du côté acide comme des bases, du côté alcalin comme des acides. Toutes les substances présentant un point isoélectrique, sont de ce chef des ampholytes. Inversement, on a vu que des cristalloïdes, comme les amino-acides, possédant une double fonction acide et basique, possédaient aussi un point isoélectrique. Les amino-acides présentent de part et d'autre de leur point isoélectrique un mode de dissociation différent.

Le glyocolle, par exemple, dont le point isoélectrique est à pH 6,2 environ, se comporte du côté acide comme une base se dissociant suivant le schéma



et du côté alcalin, comme un acide



A pH 6,2 la concentration des deux sortes d'ions ainsi mis en liberté est égale et passe par un minimum. Les amino-acides sont ainsi des ampholytes qui possèdent, pour un point donné de l'échelle des pH, un minimum de dissociation, et qui se dissocient d'ailleurs de façon différente de part et d'autre du point isoélectrique.

En tous cas, ces amino-acides sont reconnus comme des sources d'azote très convenables pour la plupart des microorganismes. Nous n'avons d'ailleurs pas à discuter ici de la supériorité relative des amino-acides, et des sels ammoniacaux.

Milieu au Glycocolle

$\text{CO}^+\text{H}-\text{CH}_2-\text{NH}_2$ PM = 75 Acide amino-acétique.

Dans ce milieu, comme dans celui au nitrate de soude, le *Rhizopus nigricans* et l'*Absidia caerulea* ne se sont pas développés. Restent donc le *Cunninghamella echinulata* toujours le plus rapide, puis suivent le *Circinella spinosa*, le *Mucor circinelloïdes* et le *Mucor spinosus*.

La vitesse de développement est très grande puisque dès la 5^e heure le *Cunninghamella echinulata* atteint le pourcentage de 25 % à pH 4,6 et 99 % à la 9^e heure à pH 3,8. Le *Circinella spinosa* 54 % à la 9^e heure à pH 7,3, et 99 % à la 13^e heure à pH 7. Le milieu semble moins favorable pour les *Mucors* comparativement aux milieux jusqu'ici étudiés. Le *Mucor circinelloïdes* commence à germer à la 13^e heure et ce n'est qu'à la 23^e heure que le taux est de 100 %. Plus lent encore est le *Mucor spinosus* 83 % à la 23^e heure.

Les limites de germination sont toutes comprises entre pH 3 et pH 9,5 dans les premières heures d'évolution.

L'existence d'un minimum dans les courbes de croissance présente ici un intérêt particulier. Les résultats déjà obtenus avec les autres milieux nous montrent que ce minimum existe, même en l'absence d'un aliment possédant un point isoélectrique. Par suite la théorie de BACH (1) ne saurait prétendre à la généralité.

Il reste à voir, si, en présence d'un amino-acide déterminé, le point isoélectrique de cette substance exerce néanmoins une action sur le minimum de croissance.

Rappelons que le point isoélectrique du glyocolle se trouve à pH 5,8 d'après BACH (4) ; à pH 6,2 d'après d'autres auteurs.

Avec le *Cunninghamella echinulata* sur les milieux déjà décrits, le minimum se trouve dans la région pH 6, c'est-à-dire très près de la zone où se place le point isoélectrique du glyocolle, par suite on ne peut s'attendre à voir ce minimum influencé par le glyocolle ; néanmoins, on peut noter que ce minimum est ici plus étendu et plus accusé. Les résultats fournis par les diverses cellules sont plus réguliers, et s'inscrivent plus facilement sur une courbe représentative.

Avec le *Circinella spinosa*, les résultats sont du même ordre, avec peut-être, en présence du glyocolle, un déplacement du côté acide.

Avec le *Mucor circinelloides* et le *Mucor spinosus* nous trouvons encore cette même tendance au déplacement du minimum vers une région plus acide.

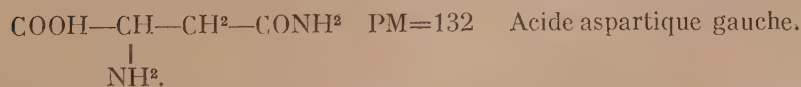
Les maximums sont situés entre pH 4 et pH 5 d'une part, et pH 7 et pH 7,5 d'autre part.

A pH 2,7, les spores grossissent beaucoup sans arriver à germer, à pH 3 les cellules géantes voisinent les filaments courts et toruleux, qui ont tendance à se ramifier et à se terminer par des proliférations anormales.

A pH 3,4 les cellules géantes sont assez rares, probablement en raison de l'alcalinisation du milieu. Enfin à pH 3,8, les filaments sont normaux.

Le *Mucor circinelloides* forme toujours de très nombreuses oïdies.

Milieu à l'Asparagine



Nous n'avons étudié sur ce milieu que le *Cunninghamella echinu-*

lata et le *Mucor spinosus*. L'asparagine comme le glyocolle constitue une excellente source d'azote pour ces organismes. Le développement y est rapide et régulier. Ainsi avec le *Cunninghamella echinulata* à la 13^e heure, la totalité des spores a germé vers pH 4, et dans tous les milieux à la 17^e heure.

Le *Mucor spinosus* a un développement plus lent et ce n'est qu'à la 23^e heure, que l'on trouve, à pH 3,75, 96 % de spores germées.

Les spores arrivent, dès la 13^e heure, à germer dans toute l'étendue de l'échelle des pH étudiés, avec un retard plus ou moins prononcé aux deux points extrêmes.

Ici le point isoélectrique de l'asparagine se trouve à pH 4,5 environ. Les minimums déjà observés avec d'autres milieux se trouvent pour ces deux espèces vers pH 6.

Si le minimum de dissociation que présente l'asparagine à pH 4,5 est susceptible de retentir sur la valeur alimentaire de cet acide-amino, nous devons nous attendre à voir le minimum de croissance déplacé nettement du côté acide.

Le glyocolle, dont le point isoélectrique se situe aux environs de pH 6, se prêtait mal à la démonstration. L'asparagine y est au contraire très favorable.

Or, il n'est pas douteux que les minimums des courbes de croissance sont ici plus nets et fortement déplacés du côté acide.

Avec le *Cunninghamella echinulata*, le minimum s'étend à la 9^e heure de pH 5 à pH 7. A la 13^e heure, les germinations sont trop avancées pour permettre une interprétation.

Avec le *Mucor spinosus* à la 13^e heure, on trouve une plage très étendue de pH 4 à pH 7, où les germinations sont pratiquement nulles, alors qu'elles atteignent 30 ou 40 % dans les milieux plus acides ou plus alcalins. A la 17^e heure, la zone du minimum est encore très accusée, et s'étend toujours de pH 4,5 à pH 7.

Chez le *Cunninghamella echinulata* on n'a pas observé de cellules géantes dans les milieux acides, mais il faut remarquer que l'observation a été interrompue à la 13^e heure, et qu'à ce moment, il est trop tôt pour observer de pareilles formations.

Par contre, il faut les signaler à pH 2,7 et pH 3 à la 23^e heure pour le *Mucor spinosus*. Filaments très irréguliers à pH 3,4 et mycélium normal à pH 3,7.

Absidia cœrulea sur Glycocolle.

pH	Spores comptées	17 ^e heure		23 ^e heure		36 ^e heure	
		Spores germées	%	Spores germées	%	Spores germées	%
2,3	87	0	0	0	0	0	0
2,7	99	0	0	0	0	0	0
3	85	0	0	0	0	0	0
3,4	111	0	0	0	0	0	0
3,8	131	0	0	0	0	0	0
4,2	126	0	0	0	0	1	0,7
4,6	202	1	0,4	10	4,9	16	7,9
4,9	152	0	0	0	0	0	0
5,3	178	0	0	7	3,9	24	13,4
5,8	205	7	3,7	29	14,1	49	23,8
6,2	155	2	1,2	5	3,2	18	11,6
6,6	162	0	0	1	0,6	6	3,7,0
7	184	3	1,6	14	7,6	37	20,0
7,3	223	5	2,2	46	20,6	Numération impossible par suite du développement du mycé- lium.	
7,6	208	2	1,5	17	8,1		
8,2	176	1	0,5	36	20,4		
9	188	0	0	5	2,6	71	37,7

Cunninghamella echinulata sur Glycocolle.

pH	Spores comptées	5 ^e heure		9 ^e heure		13 ^e heure	
		Spores germées	%	Spores germées	%	Spores germées	%
2,3	121	0	0	0	0	0	0
2,7	130	0	0	0	0	0	0
3	78	0	0	18	23,2	58	74,4
3,4	123	1	0,8	66	53,6	116	94,5
3,8	111	27	24,3	110	99,2	110	99,1
4,2	150	19	12,6	146	97,4	150	100
4,6	102	26	25,4	101	99,2	102	100
4,9	133	13	9,7	130	97,9	133	100
5,3	98	10	10,1	74	95,9	95	96,9
5,8	130	8	6,1	122	94,0	128	98,4
6,2	138	12	8,7	77	55,7	135	97,7
6,6	143	3	2,0	72	50,3	96	67,1
7	131	14	10,6	50	38,1	125	95,0
7,3	125	12	9,6	119	95,2	125	100
7,6	125	19	15,2	86	68,7	125	100
8,2	113	17	15,0	86	76,0	112	99,1
9	131	5	3,8	20	15,2	98	74,1

Mucor spinosus sur Glycocolle.

pH	Spores comptées	17 ^e heure		23 ^e heure			
		Spores germées	%	Spores germées	%		
2,3	105	0	0	0	0		
2,7	119	0	0	0	0		
3	101	0	0	33	32,6		
3,4	176	9	5,1	85	48,2		
3,8	141	0	0	43	30,4		
4,2	109	4	3,6	55	50,4		
4,6	148	12	8,1	77	52,0		
4,9	160	18	11,2	99	61,8		
5,3	138	1	0,7	21	15,2		
5,8	108	0	0	12	11,1		
6,2	134	8	5,9	32	23,8		
6,6	131	14	10,6	44	33,5		
7	106	20	18,8	77	72,5		
7,3	110	29	26,7	49	40,0		
7,6	80	44	55,0	67	83,8		
8,2	116	47	40,5	87	75,0		
9	132	15	11,3	55	41,6		

Mucor circinelloïdes sur Glycocolle.

pH	Spores comptées	13 ^e heure		17 ^e heure		23 ^e heure	
		Spores germées	%	Spores germées	%	Spores germées	%
2,3	94	0	0	0	0	0	0
2,7	81	0	0	0	0	1	1,2
3	106	0	0	7	6,3	57	53,7
3,4	140	3	2,1	64	45,6	140	100
3,8	187	4	2,1	168	89,9	187	100
4,2	189	7	3,7	120	63,6	189	100
4,6	183	0	0	69	37,6	183	100
4,9	164	0	0	88	53,6	164	100
5,3	137	0	0	9	6,5	127	92,8
5,8	—	—	—	—	—	—	—
6,2	117	0	0	16	13,6	81	69,2
6,6	120	6	5,0	64	53,8	76	63,4
7	72	12	16,6	47	65,2	61	84,7
7,3	111	16	14,5	71	63,9	103	93,0
7,6	137	9	6,5	84	61,2	137	100
8,2	123	2	1,6	28	22,7	81	65,8
9	111	0	0	10	9,1	96	85,6

Circinella spinosa sur Glycécolle.

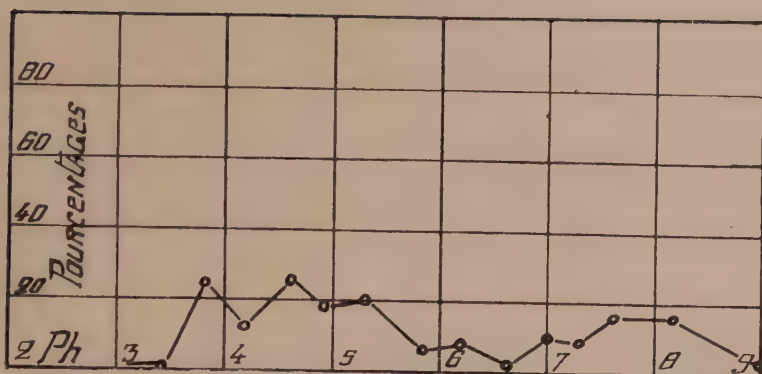
pH	Spores comptées	9 ^e heure		13 ^e heure		17 ^e heure	
		Spores germées	%	Spores germées	%	Spores germées	%
2,3	104	0	0	0	0	0	0
2,7	98	0	0	0	0	0	0
3	124	0	0	1	0,8	3	2,4
3,4	141	0	0	3	2,1	9	6,3
3,8	126	5	3,9	78	61,8	112	89,0
4,2	91	37	40,6	84	92,2	91	100
4,6	105	52	49,5	101	95,4	105	100
4,9	116	35	30,1	100	86,4	114	98,5
5,3	110	40	36,3	54	49,0	86	78,1
5,8	—	—	—	—	—	—	—
6,2	128	40	31,2	110	86,0	128	100
6,6	143	25	17,4	119	83,3	133	93,1
7	135	44	32,5	134	99,4	135	100
7,3	141	77	54,6	105	69,8	135	95,9
7,6	128	44	34,3	81	63,2	119	89,1
8,2	128	30	23,4	78	60,9	121	94,6
9	138	8	5,8	58	41,7	117	79,9

Cunninghamella echinulata sur Asparagine.

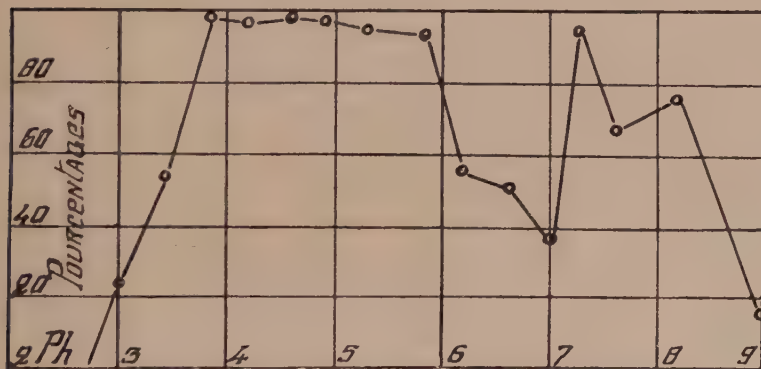
pH	Spores comptées	9 ^e heure		13 ^e heure			
		Spores germées	%	Spores germées	%		
2,3	92	0	0	0	0		
2,7	103	0	0	4	3,8		
3,05	73	0	0	15	20,5		
3,4	98	56	58,9	98	100		
3,75	145	51	35,1	145	100		
4,15	106	60	56,5	106	100		
4,6	104	79	75,9	104	100		
4,9	98	15	15,3	83	84,6		
5,35	129	42	32,5	129	100		
5,75	121	9	7,4	70	57,8		
6,1	146	23	18,2	144	98,6		
6,35	110	4	3,6	77	70,0		
6,55	116	37	31,8	107	92,2		
7	97	10	10,3	39	40,2		
7,45	86	13	15,1	75	87,2		
7,7	138	86	62,3	136	98,5		
8,15	65	10	15,3	51	78,4		
9,1	109	1	0,91	37	33,9		

Mucor spinosus sur Asparagine.

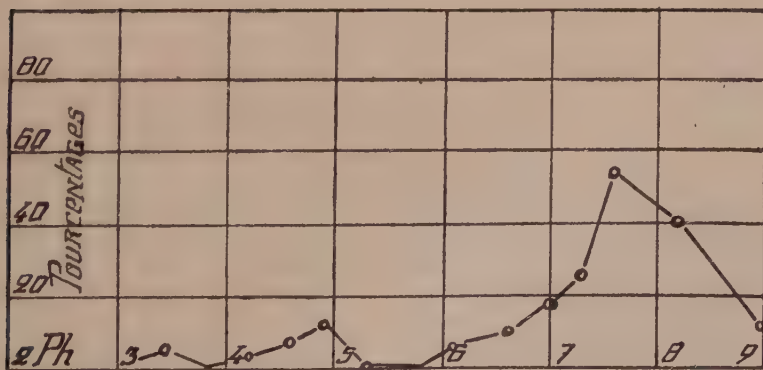
pH	Spores comptées	13 ^e heure		17 ^e heure		23 ^e heure	
		Spores germées	%	Spores germées	%	Spores germées	%
2,3	147	0	0	0	0	6	4,0
2,7	158	17	10,7	42	26,4	50	31,6
3,05	144	7	4,8	24	16,6	86	59,6
3,4	138	23	16,6	81	58,5	129	93,6
3,75	136	47	34,5	108	79,5	131	96,4
4,15	133	8	6,0	29	21,8	54	40,5
4,6	147	2	1,3	13	8,9	64	43,5
4,9	140	2	1,3	19	13,5	72	51,4
5,35	110	2	1,8	6	5,4	21	19,0
5,75	169	0	0	1	0,5	28	16,5
6,1	146	0	0	2	1,3	7	4,7
6,35	157	2	1,2	3	1,9	82	52,2
6,55	128	3	2,3	9	7,0	23	17,9
7	153	1	0,6	7	4,5	10	6,5
7,45	146	18	12,3	53	36,2	85	58,2
7,7	95	21	22,2	39	41,0	44	46,3
8,15	128	10	7,8	25	19,5	29	22,6
9,1	126	5	3,9	27	21,4	57	45,2



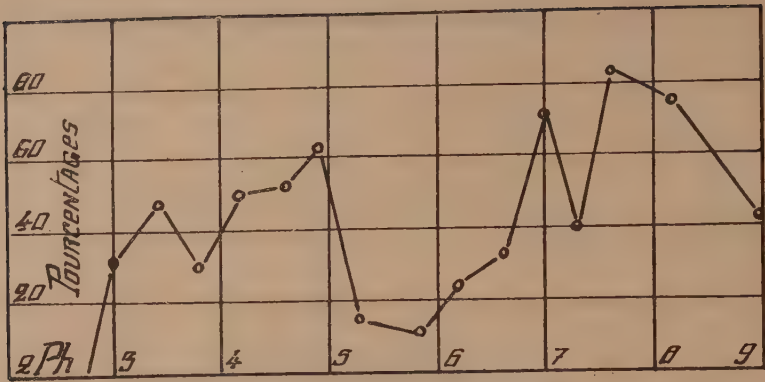
Cunninghamella echinulata sur Glycocolle à la 5^e heure.



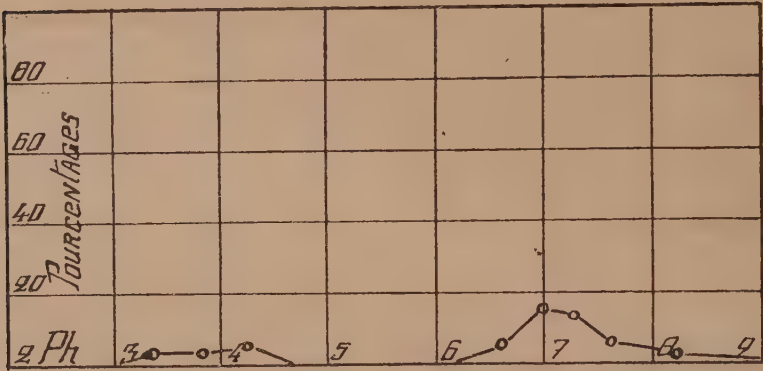
Cunninghamella echinulata sur Glycocolle à la 9^e heure.



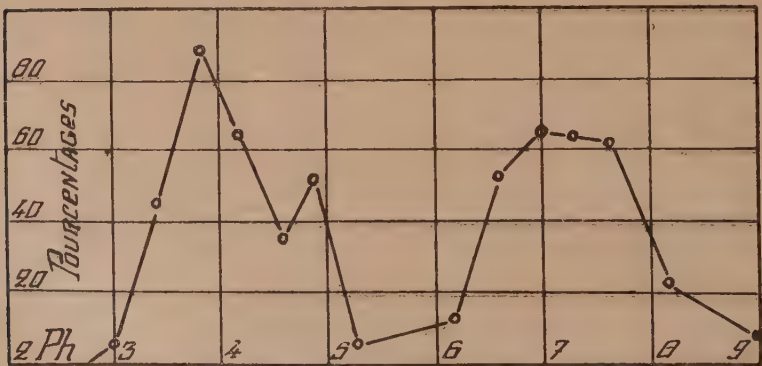
Mucor spinosus sur Glycocolle à la 17^e heure.



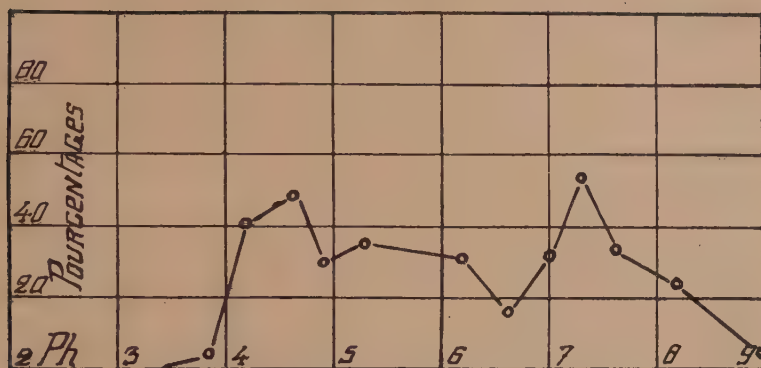
Mucor spinosus sur Glycocolle à la 23^e heure.



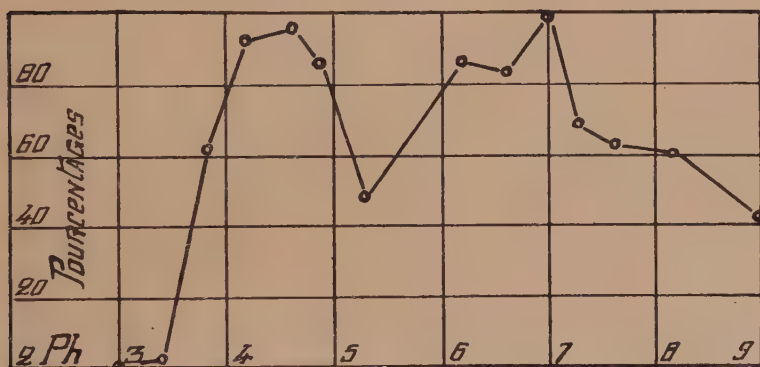
Mucor circinelloides sur Glycocolle à la 13^e heure.



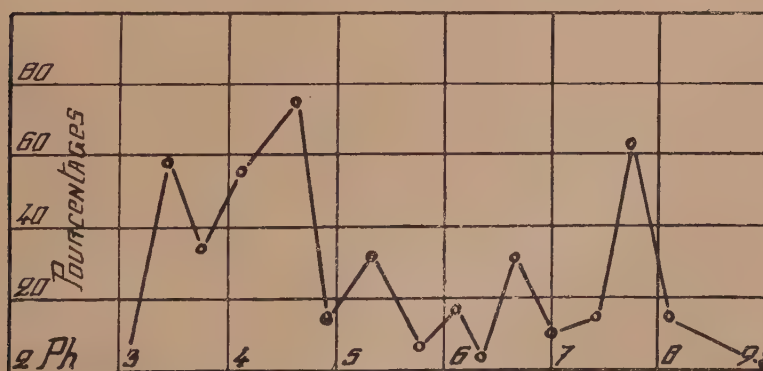
Mucor circinelloides sur Glycocolle à la 17^e heure.



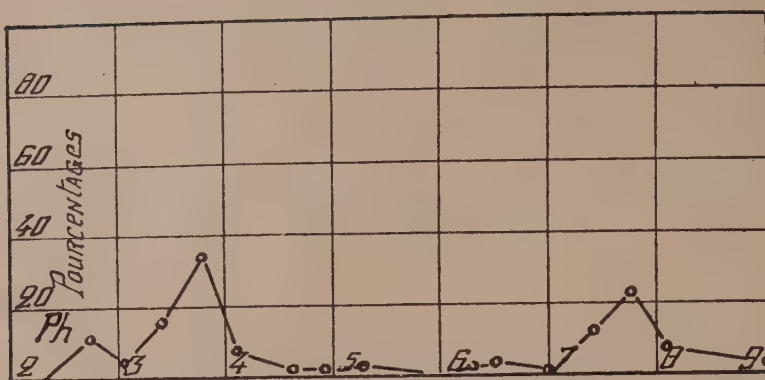
Circinella spinosa sur Glycocolle à la 9^e heure.



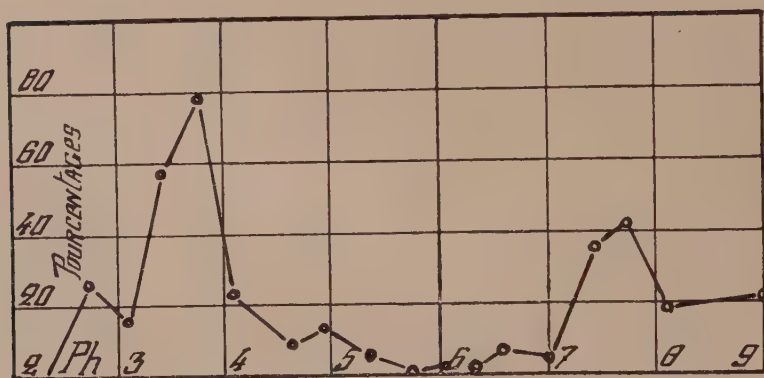
Circinella spinosa sur Glycocolle à la 13^e heure.



Cunninghamella echinullata sur Asparagine à la 9^e heure.



Mucor spinosus sur Asparagine à la 13^e heure.



Mucor spinosus sur Asparagine à la 17^e heure.

CHAPITRE QUATRIÈME

UTILISATION DE L'AZOTE PEPTIDIQUE.

L'azote provient cette fois de la peptone, qui est un ensemble d'acides aminés et de polypeptides. Cette substance, ne possédant pas de point isoélectrique, n'aura donc pas d'influence spécifique sur le minimum de germination.

Il est reconnu que c'est un excellent aliment, surtout en présence de sucre, car ce dernier fournit l'aliment hydrocarboné nécessaire au développement.

La germination est dans ce milieu plus rapide que dans tous les autres, et l'ordre de germination pour les espèces étudiées est le suivant :

Cunninghamella echinulata, *Circinella spinosa*, *Rhizopus nigricans*, *Mucor circinelloïdes*, *Mucor spinosus* et *Absidia cœrulea*.

Dès la 5^e heure, on trouve déjà chez le *Cunninghamella echinulata* 5,1 % de spores germées à pH 5,3 et à la 9^e heure presque tous les milieux sont à 100 %

La vitesse de développement est peut-être légèrement plus grande pour le *Rhizopus nigricans* que pour le *Circinella spinosa* ; en effet à la 9^e heure les taux de ce dernier sont plus élevés, mais à la 13^e heure c'est l'inverse.

Le *Mucor circinelloïdes* atteint 46 % à pH 4,2 à la 9^e heure, tandis que le *Mucor spinosus* est à 20 % à pH 8,5. *Absidia* ne germe guère avant la 13^e heure.

La limite alcaline de germination n'a pas été atteinte, il semble que celle du côté acide soit aux environs de pH 3, sauf pour le *Cunninghamella echinulata*, qui s'avance jusque vers pH 2,5.

Dans tous les cas, nous pouvons relever la présence d'un minimum. La position des deux maximums et du minimum sont résumés dans le tableau suivant :

	1 ^{er} Maximum	Minimum	2 ^e Maximum
	pH	pH	pH
<i>Cunninghamella echinulata</i>	5	6,5	7,5
<i>Circinella spinosa</i>	5,5	6,5	8,5

<i>Rhizopus nigricans</i>	4	6,5	7,5
<i>Mucor circinelloides</i>	4	6	8
<i>Mucor spinosus</i>	4	6	8
<i>Absidia cœrulea</i>	4	5,5-6	7,5

Le minimum est donc compris, suivant les cas, entre pH 6 et 6,5, deux valeurs assez voisines. Il en est de même d'ailleurs, pour les maximums.

A la 23^e heure, les cellules géantes sont localisées dans les milieux à pH 2,6 et pH 3,1 avec tous les organismes.

Les oïdies apparaissent très nombreuses avec le *Mucor circinelloides* et l'*Absidia cœrulea*.

A signaler également, la production de filaments aériens, qui dénotent un bon développement et par suite un bon milieu.

Cunninghamella echinulata sur Peptone.

pH	Spores comptées	5 ^e heure		9 ^e heure			
		Spores germées	%	Spores germées	%		
2,2	97	0	0	0	0		
2,6	108	0	0	10	9,2		
3,1	95	3	3,1	94	98,9		
3,4	93	8	8,6	93	100		
3,8	100	32	32,0	100	100		
4,2	79	5	6,3	79	100		
4,6	86	15	17,4	86	100		
4,6	85	12	14,1	85	100		
5,3	74	38	51,3	74	100		
5,8	83	17	20,4	83	100		
6,3	77	8	10,3	71	92,3		
6,6	93	2	2,1	81	87,1		
7	88	13	14,7	88	100		
7,7	77	11	14,2	77	100		
8,5	113	15	13,2	113	100		
9,2	63	7	11,1	61	96,8		

Circinella spinosa sur Peptone.

pH	Spores comptées	9 ^e heure		13 ^e heure		17 ^e heure	
		Spores germées	%	Spores germées	%	Spores germées	%
2,2	114	0	0	0	0	0	0
2,6	99	0	0	0	0	0	0
3,1	103	0	0	1	0,9	7	6,8
3,4	134	2	1,4	41	30,5	89	66,4
3,8	130	0	0	97	74,5	128	98,6
4,2	133	13	9,7	97	72,8	129	97,1
4,6	128	48	37,4	127	99,2	128	100
4,9	112	60	53,5	103	91,9	112	100
5,3	109	47	43,1	107	98,0	109	100
5,8	133	85	63,9	132	99,2	133	100
6,3	126	26	20,6	116	91,9	126	100
6,6	127	62	48,8	101	79,4	127	100
7	116	95	81,9	116	100	116	100
7,7	128	80	62,5	116	90,6	128	100
8,5	122	121	99,1	122	100	122	100
9,2	110	101	92,6	110	100	110	100

Rhizopus nigricans sur Peptone.

pH	Spores comptées	9 ^e heure		13 ^e heure			
		Spores germées	%	Spores germées	%		
2,2	157	0	0	0	0		
2,6	163	0	0	0	0		
3,1	130	0	0	57	43,8		
3,4	123	7	5,6	116	94,3		
3,8	97	21	21,6	97	100		
4,2	162	13	8,4	162	100		
4,6	160	14	8,7	159	99,4		
4,9	175	6	3,4	174	99,4		
5,3	141	1	0,7	129	91,4		
5,8	128	4	3,1	126	98,4		
6,3	147	0	0	132	89,8		
6,6	131	1	0,7	89	67,9		
7	168	31	18,4	165	98,2		
7,7	123	35	27,6	122	99,1		
8,5	88	14	15,9	88	100		
9,2	129	6	4,6	109	84,4		

Mucor circinelloïdes sur Peptone.

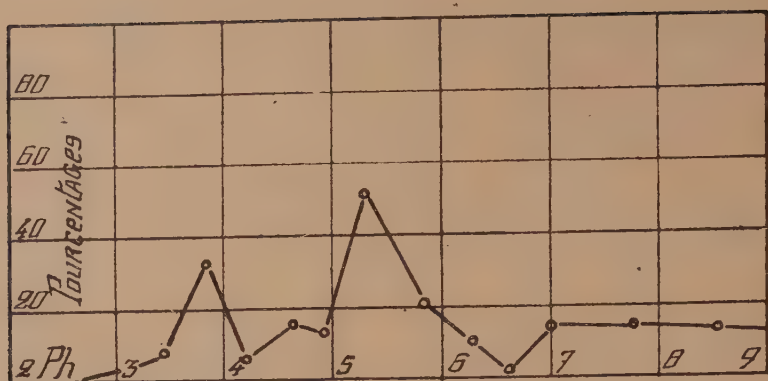
pH	Spores comptées	9 ^e heure		13 ^e heure		17 ^e heure	
		Spores germées	%	Spores germées	%	Spores germées	%
2,2	125	0	0	0	0	0	0
2,6	154	0	0	0	0	0	0
3,1	102	0	0	5	4,9	11	10,7
3,4	126	3	2,3	28	22,2	89	70,6
3,8	108	30	27,7	65	60,2	92	85,1
4,2	114	53	46,4	94	82,4	114	100
4,6	104	16	15,3	76	73,0	104	100
4,9	139	2	1,4	117	84,1	139	100
5,3	117	2	1,7	115	98,2	117	100
5,8	107	0	0	87	81,3	107	100
6,3	113	1	0,8	57	50,4	113	100
6,6	122	1	0,8	104	85,2	122	100
7	115	12	10,4	107	93,0	115	100
7,7	105	18	17,1	102	97,1	105	100
8,5	123	16	13,7	98	79,6	99	85,5
9,2	92	24	26,1	75	81,5	92	100

Mucor spinosus sur Peptone.

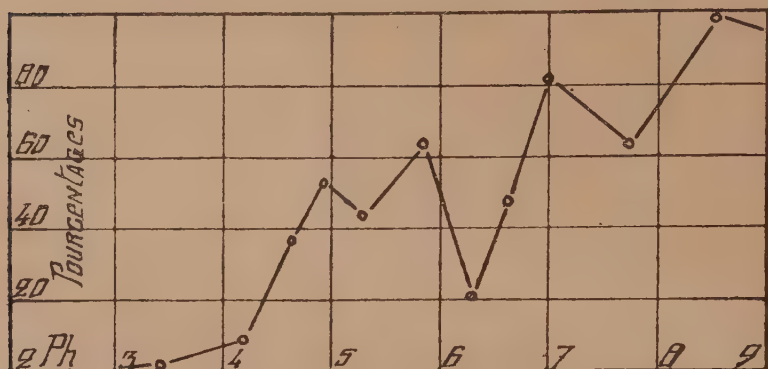
PH	Spores comptées	9 ^e heure		13 ^e heure		17 ^e heure		23 ^e heure	
		Spores ger- mées	%	Spores ger- mées	%	Spores ger- mées	%	Spores ger- mées	%
2,2	72	0	0	0	0	0	0	0	0
2,6	110	0	0	0	0	0	0	0	0
3,1	128	0	0	11	8,6	26	20,3	29	22,6
3,4	—	—	—	—	—	—	—	—	—
3,8	108	9	8,3	20	18,5	37	34,2	55	50,8
4,2	144	12	8,3	36	24,9	111	77,0	140	97,4
4,6	129	1	0,7	25	19,3	113	87,6	129	100
4,9	105	2	1,9	8	7,6	76	72,3	105	100
5,3	121	3	2,4	11	9,0	82	67,7	118	97,6
5,8	141	3	2,1	4	2,8	118	83,6	141	100
6,3	93	0	0	13	13,9	70	75,2	93	100
6,6	104	1	0,9	22	21,1	80	76,9	104	100
7	114	1	0,8	36	31,5	105	92,1	114	100
7,7	136	13	9,5	87	63,9	132	97,0	136	100
8,5	109	22	20,1	65	59,5	101	92,6	109	100
9,2	106	11	10,3	49	46,2	71	66,9	106	100

Absidia cœrulea sur Peptone.

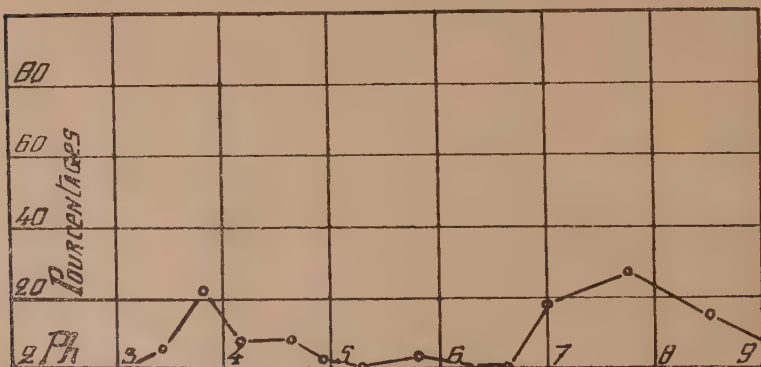
PH	Spores comptées	9 ^e heure		13 ^e heure		17 ^e heure	
		Spores germées	%	Spores germées	%	Spores germées	%
2,2	163	0	0	0	0	0	0
2,6	187	0	0	0	0	0	0
3,1	149	0	0	0	0	7	4,6
3,4	144	0	0	6	4,1	81	56,2
3,8	177	0	0	14	7,9	82	46,3
4,2	226	3	1,3	124	54,8	220	97,3
4,6	223	1	0,4	54	25,3	196	87,8
4,9	204	1	0,4	22	10,7	109	53,4
5,3	172	0	0	40	23,2	170	98,8
5,8	273	0	0	38	13,9	269	98,4
6,3	252	1	0,3	43	17,0	241	95,5
6,6	214	1	0,4	125	58,3	214	100
7	234	0	0	96	41	234	100
7,7	216	6	2,7	149	68,9	215	99,4
8,5	182	8	4,3	101	55,4	167	91,6
9,2	136	0	0	8	5,81	48	35,2



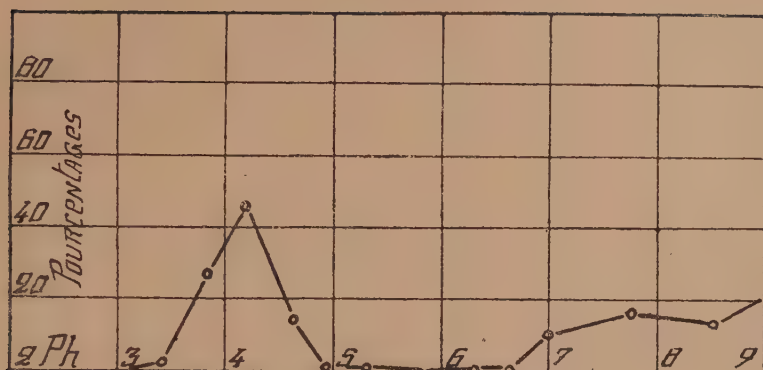
Cunninghamella echinulata sur Peptone à la 5^e heure.



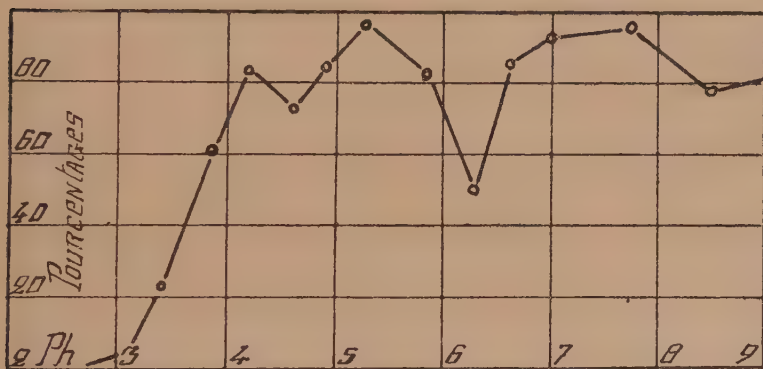
Circinella spinosa sur Peptone à la 9^e heure.



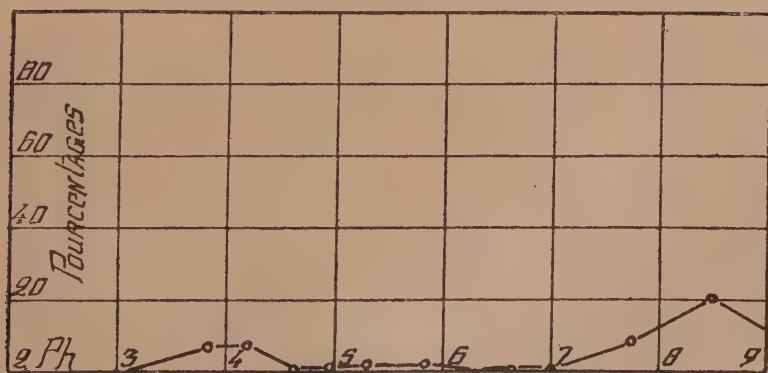
Rhizopus nigricans sur Peptone à la 9^e heure.



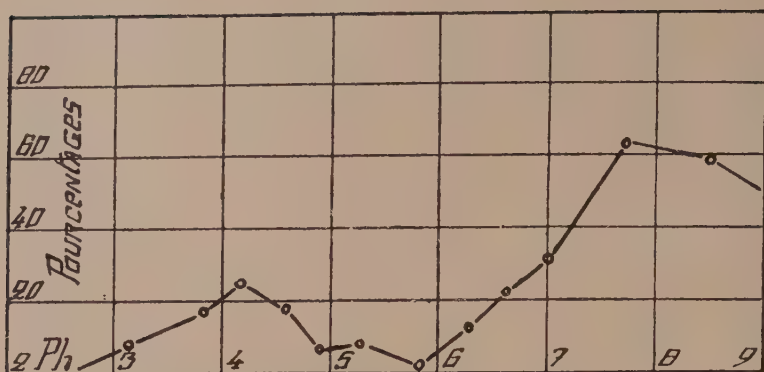
Mucor circinelloïdes sur Peptone à la 9^e heure.



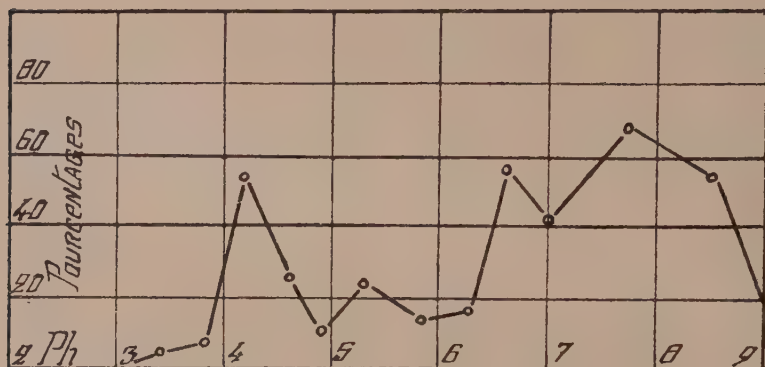
Mucor circinelloïdes sur Peptone à la 13^e heure.



Mucor spinosus sur Peptone à la 9^e heure.



Mucor spinosus sur Peptone à la 13^e heure.



Absidia cœrulea sur Peptone à la 13^e heure.

DISCUSSION GÉNÉRALE

Les courbes à deux maximums séparés par un minimum ont été observées par de nombreux auteurs et avec les organismes les plus variés : bactéries, champignons, plantes supérieures.

Nous les avons également obtenues avec les six Mucorinées étudiées et avec les différentes sources d'azote employées. On est certainement en présence d'un fait général.

On peut résumer comme suit, les théories qui ont été émises pour expliquer ces courbes :

1° On se trouve en présence d'un mélange de deux espèces dont l'une est particulièrement favorisée par les ions H et l'autre par les ions OH. Les courbes obtenues sont une résultante.

On peut ruiner cette théorie d'une manière très simple, en partant de cultures monospores. Nous avons précisément avec le *Mucor spinosus*, utilisé des cultures obtenues à partir d'une seule spore. Cette souche présente aussi régulièrement que les autres le phénomène du double maximum.

2° Les deux optimums peuvent correspondre, l'un à la concentration optimum des ions H, l'autre à la concentration optimum des ions OH. Les courbes de croissance en fonction du pH seraient en réalité la résultante de l'action de deux facteurs distincts, ayant chacun une zone plus particulièrement favorable. Dans l'état actuel de la science, il paraît difficile de faire le départ entre les actions spécifiques des deux ions issus de la dissociation de l'eau.

3° Le minimum de WEBB est sous la dépendance du point isoélectrique des cellules végétales. Cette théorie a d'abord été émise par ROBBINS. Pour lui, les tissus végétaux possèdent un point isoélectrique, dû à leurs protéines et il admet qu'à ce point isoélectrique les protéines sont facilement coagulables et altérables.

DENNY et YODEN ont montré les erreurs d'expérience commises par ROBBINS, ce qui diminue singulièrement la valeur de ses conclusions.

D'autre part, le pH intérieur cellulaire est pratiquement invariable. Les cellules possèdent des mécanismes variés pour défendre la cons-

tance de leur réaction, qui ne varie jamais que dans d'étroites limites. Le phénomène ne paraît pas pouvoir être dû à des modifications dans les réactions qui se passent à l'intérieur de la cellule.

4° Modification de la perméabilité cellulaire. L'entrée et la sortie des aliments dans une cellule sont réglées par des mécanismes encore mal connus. Les échanges se font à travers la membrane plasmique, par des phénomènes plus complexes que l'osmose simple, et où la membrane joue un rôle actif par sa nature, son état physique.

Il est admis aujourd'hui que cette membrane plasmique n'a pas d'existence propre. C'est la couche la plus externe du gel protoplasmique, modifié dans son état physique par le contact avec le milieu extérieur.

Les travaux modernes de MISS RUTH ADDOMS, de MEVIUS, etc., ont montré que la perméabilité cellulaire était réglée par la concentration des ions H. Le minimum de perméabilité correspond au point isoélectrique des protéines constitutives. De part et d'autre de ce point, une variation du pH occasionne d'abord, une augmentation de la perméabilité et par suite des échanges nutritifs ; puis se produisent des phénomènes toxiques dus à la pénétration des ions toxiques.

5° Hypothèse de BACH. Modification de la dissociation des amino-acides suivant la réaction. Cette théorie n'est, à tout prendre, qu'un cas particulier de la précédente. En effet, à leur point isoélectrique, ces corps sont presque en entier à l'état moléculaire, et présentent alors un minimum d'absorption.

On admet généralement, que seules, les substances à l'état d'ions, sont capables de pénétrer à l'intérieur du protoplasma ; autrement dit, seuls les ions sont assimilables.

Les amino-acides étant peu ou pas dissociés à leur point isoélectrique, présentent à ce moment, un minimum de concentration de leurs ions constitutifs. Ils doivent donc présenter à cet instant, un minimum d'assimilabilité.

De part et d'autre du point isoélectrique, la concentration des ions d'acide-amino augmente, et par suite la valeur nutritive de ces substances. Autrement dit, les courbes de WEBB seraient calquées sur les courbes de dissociation des amino-acides.

Dans quelle mesure nos expériences sont-elles explicables par l'une ou l'autre de ces hypothèses ?

Un premier fait est évident : les courbes à deux maximums se retrouvent avec les différentes sources d'azote utilisées, à condition

de faire l'observation à des moments favorables. Or, ni les sels ammoniacaux, ni les nitrates ne présentent un minimum de dissociation, compris entre deux maximums. Le phénomène observé ne semble donc pas dû à un état particulier du milieu ; cela conduit à le rapporter à une propriété spécifique du tissu vivant.

Il faut noter cependant, que dans le cas du succinate d'ammoniaque, la dépression de la courbe est peu prononcée, et ne dépasse guère, pour la plupart des espèces, les variations inévitables dans ce genre d'expériences. D'ailleurs, dans nos premières observations, avec le *Mucor spinosus*, nous avons cru pouvoir admettre qu'il n'y avait pas de minimum intermédiaire.

Le nitrate de soude paraît au contraire plus favorable à la mise en évidence du phénomène. Avec la peptone, le minimum est évident dans la plupart des cas, mais vite masqué par l'évolution rapide des cultures.

Si le minimum est dû à une propriété particulière de la cellule végétale, il doit se retrouver, non seulement sur tous les milieux, mais il doit occuper aussi dans tous les cas, une position analogue. Or, c'est entre pH 6 et 6,6 qu'on l'observe le plus souvent, avec des différences d'ailleurs considérables.

Ce que nous savons de la variation du pH, dans les cultures de champignons quand la source d'azote varie, peut en partie nous expliquer la difficulté d'obtenir des résultats cohérents.

Si les amino-acides exercent une action propre sur le minimum de germination, cela se traduira, soit par une accentuation, soit par un déplacement du minimum.

Avec le glycoçolle dont le point isoélectrique est suivant les auteurs à pH 5,8 ou à 6,2 c'est-à-dire dans la zone où nos Mucorinées présentent normalement leur minimum, il ne faut pas s'attendre à voir ce dernier point déplacé. En fait, il ne l'est pas, mais il est alors plus net, plus accentué ; les résultats sont plus cohérents.

Ainsi pour l'*Absidia cœrulea*, où le minimum sur les autres milieux est peu prononcé et variable, on observe ici à la 23^e heure et à la 36^e heure, une courbe régulière, à minimum très accentué. Il en est de même avec les autres espèces.

C'est l'asparagine enfin, qui avec son point isoélectrique à pH 4,5 (BACH 4), doit nous fournir l'expérience cruciale. En présence de ce corps, le minimum de germination doit être déplacé du côté acide.

L'expérience a été faite avec le *Mucor spinosus* et le *Cunninghamella echinulata*.

Avec le *Mucor spinosus*, qui fournit sur les autres milieux un

minimum entre pH 6 et pH 6,6, nous voyons ici le minimum s'étendre de pH 6 à pH 7 à la 13^e heure, puis cette zone se restreindre et se localiser vers pH 6 à la 17^e heure. Il est probable qu'à ce moment, les ferments produits par le champignon ont donné de l'aspartate d'ammoniaque et la présence de l'ion NH^4 soustrait l'organisme à l'influence de la dissociation de l'asparagine.

Avec le *Cunninghamella echinulata*, les résultats sont moins nets. Cependant à la 9^e heure, on observe bien une zone de germination minimum de pH 4,9 à pH 6,55.

Ces expériences sont pleines de promesses. Elles mériteraient d'être complétées avec d'autres microorganismes et des amino-acides à point isoélectrique aussi variés que possible tels que la glutamine, l'acide aspartique, l'acide glutamique, etc.

En somme, l'existence d'un minimum, quel que soit l'aliment azoté, confirme les observations initiales de WEBB, et montre que ce phénomène doit être sous la dépendance d'une propriété générale des tissus végétaux. L'explication la plus satisfaisante consiste à admettre une modification de la perméabilité cellulaire, qui présente un minimum au point isoélectrique de la principale protéine du tissu.

Si, d'autre part, le milieu présente, pour une certaine concentration en ions H, un minimum de concentration d'ions assimilables, ce fait vient se superposer au précédent, soit pour l'accentuer, soit pour le modifier.

CONCLUSIONS

1° Nous avons étudié, par la méthode des gouttes pendantes et suivant une technique minutieusement réglée, l'influence de la réaction sur la germination des spores de 6 espèces de Mucoriniées : *Mucor spinosus*, *Mucor circinelloides*, *Circinella spinosa*, *Absidia caerulea*, *Rhizopus nigricans*, *Cunninghamella echinulata*, dans des milieux où la source d'azote était variable.

2° Du côté acide, la germination s'arrête généralement vers pH 3 sauf pour les espèces très sensibles à la concentration des ions H, comme *Circinella spinosa*. Cette limite est abaissée jusqu'à pH 3,5 et pH 4 quand la source d'azote est un sel ammoniacal. Elle est au contraire plus élevée (pH 3-pH 2,5) quand la source d'azote est un nitrate alcalin ou mieux un amino-acide ou de la peptone.

3° Du côté alcalin, les limites extrêmes n'ont souvent pas été observées, bien que nos observations se soient étendues jusqu'à pH 9 et même pH 9,8. Ainsi *Cunninghamella echinulata*, *Circinella spinosa*, *Absidia caerulea* germent encore abondamment à pH 9,8.

4° Entre les deux limites inférieures et supérieures, les courbes représentant le pourcentage des spores germées en fonction de la réaction ne sont généralement pas des courbes en chapeau. Elles révèlent le plus souvent l'existence des deux optimums séparés par un minimum parfois très prononcé. Le phénomène est particulièrement net dans les premières heures de l'expérience.

Il s'atténue ensuite quand le pourcentage des spores germées tend uniformément vers 100.

5° On peut réunir, dans le tableau suivant, les chiffres les plus significatifs parmi ceux que nous avons obtenus.

6° Le minimum intermédiaire peut s'observer dans tous les milieux, et avec toutes les espèces. Cependant, avec les amino-acides, il est plus facile à obtenir, et dans le cas de l'asparagine il occupe une zone plus étendue qu'avec les autres milieux.

7° Au cours de notre travail, nous avons souvent observé des cellules géantes dans les milieux acides jusqu'à pH 4. Certaines espèces : *Mucor spinosus*, *Mucor circinelloides* constituent des objets d'étude particulièrement favorables. Nous avons mentionné après beaucoup d'autres, l'influence favorisante des sels ammoniacaux

	Ni- trate de soude	Succi- nate d'NH ³	Glyco- colle	Aspa- ragine	Pep- tone	
<i>Mucor spinosus</i>	4	5	5	3,5	4	1 ^{er} Maximum
	6,5	6	5,5	4-7	6	Minimum
	7	7	7,5	7,5	8	2 ^e Maximum
<i>Mucor circinelloïdes</i>	4	6	4		4	1 ^{er} Maximum
	6,5	6,5	5,5		6	Minimum
	8	7,5	7		8	2 ^e Maximum
<i>Cunninghamella echinulata</i>	5	4,5	4,5	4,5	5	1 ^{er} Maximum
	6	5	5,5-6,5	5-7	6,5	Minimum
	7	5,5	7,5	7,5	7,5	2 ^e Maximum
<i>Circinella spinosa</i>		5,5	4,5		5,5	1 ^{er} Maximum
		6,5	6,5-5,5		6,5	Minimum
		7	7		8,5	2 ^e Maximum
<i>Absidia cœrulea</i>		6	5,5		4	1 ^{er} Maximum
		6,5	6,5		5-6	Minimum
		7,5	7		7,5	2 ^e Maximum
<i>Rhizopus nigricans</i>	4,5				4	1 ^{er} Maximum
	6,5				6,5	Minimum
	7				7,5	2 ^e Maximum

qui sont, suivant l'expression des agronomes, des aliments physiologiquement acides.

8° Nous avons remarqué que les expériences de germination ne sont comparables entre elles que si les gouttes examinées renferment à peu près le même nombre de spores. Toutes choses égales d'ailleurs, les spores germent d'autant plus vite qu'elles sont plus nombreuses.

9° Les milieux renfermant des amino-acides et un sucre ne sont pas stérilisables par la chaleur. En milieu alcalin notamment, on observe une coloration de la solution, et une acidification prononcée atteignant plusieurs unités pH.

VU :

Le Président de la Thèse,
RADAIS.

VU :

Le Doyen de la Faculté,
RADAIS.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER :

Le Recteur de l'Académie,
S. CHARLÉTY.

BIBLIOGRAPHIE

- ADDOMS (R. Miss). — Toxicity as evidenced by changes in the protoplasmic structure of root hairs of wheat. — *Amer. Journ. of Bot.*, 1928, **14**, 147.
- ARMSTRONG (G.). — Studies in the physiology of the fungi XIV. Sulphur nutrition : the use of thiosulphate as affected by hydrogen ion concentration. — *Ann. Miss. Bot. Gard.*, 1921, **8**, 237.
- ARRHENIUS (O.). — Hydrogen ion concentration, soil properties and growth of higher plants. — *Arki. Bot.*, 1922, **18**, 1.
- BACH (D.) (1). — Contribution à l'étude de la nutrition azotée de l'*Aspergillus repens* de Bary. Influence de la réaction du milieu. — *Thèse de Doctorat ès-Sciences*, Paris, 1925.
- (2) La nutrition azotée des Mucorinées. Assimilation des sels ammoniacaux. — *C. R. Ac. Sc.*, 1927, **184**, 766.
- (3) La nutrition azotée des Mucorinées. Assimilation de l'ion nitrique. — *C. R. Ac. Sc.*, 1927, **185**, 1578.
- (4) Sur une méthode applicable à la détermination du point isoélectrique des amino-acides. Cas de l'asparagine et du glycocolle. — *Bull. Soc. Chim. biol.*, 1927, **9**, 1233.
- (5) Dispositif simple pour mesurer et répartir aseptiquement les liquides stériles. — *Bull. Sc. Pharmacol.*, 1927, **34**, 691.
- BAINIER (G.) (1) Nouvelles observations sur les zygospores des Mucorinées. — *Ann. Sc. Nat. Bot.*, 1884 (6), **19**.
- (2) *Absidia cærulea*. — *Bull. Soc. Bot. de France*, 1889, **33**, 184.
- BEAUVERIE (J.). — Etudes sur le polymorphisme des Champignons. — Influence du milieu. — *Th. Doct. ès-sciences. Lyon*, 1900.
- BERTHELOT (A.) et AMOUREUX Mlle (G.). — Sur l'auto-élimination de l'ammoniaque dans les cultures microbiennes. — *Bull. Soc. Chim. Biol.*, 1927, **9**, 932.
- BONORDEN. — *Mucor Plumbeus*. — *Abh. naturf. ges. Halle*, 1864, **8**, 109.
- BOYLE (C.). — Studies in the physiology of parasitism. The growth reactions of certain fungi to their staling products. — *Ann. of Bot.*, 1924, **38**, 113.
- BRIGHTMAN (C.), MEACHAM (M.) and ACREE (S.). — A spectrophotometric study of the « salt effects » of phosphate upon the color of phenol-sulfone-phthaleine salts and some biological applications. — *Journ. Bacter.*, 1920, **5**, 169.
- BROOKS (C.). — Temperature and toxic action. — *Bot. Gazette*, 1906, **42**, 359.
- CLARK (J. F.). — On the toxic effect of deleterious agents on the germination and development of certain filamentous fungi. — *Bot. Gazette*, 1899, **28**, 289.

- CLARK (M.) and LUBS (M.). — The colorimetric determination of hydrogen ion concentration and its application in Bacteriology. — *Journ. Bacter.*, 1927, **2**, 1, 109, 191.
- COHEN (B.) and CLARK (M.). — The growth of certain bacteria in media of different hydrogen ion concentrations. — *Journ. Bacter.*, 1919, **4**, 409.
- COLE (A.). — Effect of variations in hydrogen ion concentration on the growth of seedlings. — *Thesis Univ., Mo.*, 1922.
- COOLEY (J.). — A study of the physiological relations of *Sclerotinia cinerea* (Bon) Schröter. — *Ann. Miss. Bot. Gard.*, 1924, **1**, 291.
- COULTER (C. B.). — The isoelectric point of red blood cells and its relation to agglutination. — *Journ. of gen. Physiol.*, 1920-21, **3**, 309.
- CURRIE (J.). — The citric acid fermentation of *Aspergillus niger*. — *Journ. of biol. chem.*, 1917, **31**, 15.
- CZAPEK (F.) (1). — Untersuchungen über die Stickstoffgewinnung und Eiweissbildung der Pflanzen. — *Hofmeisters Beiträge*, 1901, **1**, 538 et **2**, 557.
- (2) Zur Kenntniss der Stickstoffversorgung und Eiweissbildung bei *Aspergillus niger*. — *Ber. d. deut. bot. Gesell.*, 1901, **19**, 137.
- DENNY (F.) and YOUNDEN (W.) (1). Factors influencing the PH equilibrium known as the isoelectric point of plant tissue. — *Amer. Journ. of Bot.*, 1926, **13**, 743.
- (2) Acidification of unbuffered salt solutions by plant tissue in relation to the question of tissue isoelectric points. — *Amer. Journ. of Bot.*, 1927, **14**, 395.
- DONALD (M.). — The synthesis of « Bios » by yeast grown in a solution of purified nutrients. — *Journ. of biol. Chem.*, 1923, **56**, 489.
- DUGGAR (B. M.). — Physiological studies with reference to the germination of certain fungous spores. — *Bot. Gazette*, 1901, **31**, 38.
- EHRENBERG (C.). — *Nova Acta Acad. Leop.*, 1820, 198.
- EULER (H.) und JOSEPHSON (K.). — Ueber Reaktionen Zwischen Zuckerarten und Aminen I Eine Reaction Zwischen Glucose und glykokoll. — *Ztschr. für physiol. Chem.*, 1926, **153**, 1.
- EZEKIEL (U.). — Hydrogen ion concentration and development of *Sclerotinia Apothecia*. — *Science*, 1923 (166), 31 août.
- FISCHER (A.). — Wasserstoff und Hydroxylionen als Keimungsreize. — *Ber. d. deut. bot. Gesell.*, 1923, **25**, 108.
- FUNK (C.) and DUBIN (H.). — Vitamine requirements of certain yeasts and bacteria. — *Journ. of Biol. Chem.*, 1921, **48**, 437.
- FUNK (C.) and FREEDMAN. — The presence of an Yeast growth promoting vitamine in cane sugar. — *Journ. of biol. Chem.*, 1923, **56**, 851.
- FULMER (E.), NELSON (K.) and SHERWOOD (F.). — The nutritional requirements of yeast. I. The role of vitamins in the growth of yeast. — *Journ. Am. Chem. Soc.*, 1921, **43**, 186.
- GAYNEY. — Soil reaction and the growth of *Azotobacter*. — *Journ. Agri. Res.*, 1918, **15**, 265.
- GILLESPIE. — The growth of the potato scab organism at various hydrogen ion concentrations as related to the comparative freedom of acid soils from the potato scab. — *Phytopathology*, 1918, **8**, 257.

- HARDY (W.-B.). — A preliminary investigation of the conditions which determine the stability of irreversible hydrosols. — *Procee. Roy. Soc.* 1900, **65**, 110.
- HIXON (R.). — The effect of the reaction of a nutrient solution on the germination and the first stages of plant growth. — *Medd. Vetenskapsakad. Nobelinstitut*, 1920, **4**, 1.
- HOPKINS (E.). (1) — Growth and germination of *Gibberella Saubinetii* at varying hydrogen ion concentrations. — *Phytopathology*, 1921, **11**, 36.
- (2) Hydrogen ion concentration in its relation to the Wheat scab. — *Amer. Journ. of Botany*, 1922, **9**, 159.
- KARRER (J.). — Studies in the physiology of the fungi. XII. The effect of hydrogen ion concentration upon the accumulation and activation of amylase produced by certain parasitic fungi. — *Ann. Miss. Bot. Gard.*, 1921, **8**, 63.
- KLOTZ (J.). — Some aspects of nitrogenous metabolism in fungi. — *Ann. Miss. Bot. Gard.*, 1923, **10**, 1.
- KRÖNIG (B.) and PAUL (P.). — Die Chemischen Grundlagen der Lehre von der Gifwirkung und Desinfektion. — *Ztschr. f. Hyg. U. Infekt.* 1897, **25**, 1.
- KURONO (K.). — Significance of organin for the nutrition of fermentative organisms. — *Chem. Abstr.*, 1915, **9**, 2791.
- LANGERON (M.). — Examen en chambre humide. — *Précis de Microscopie*, Masson, Paris, 1926, 237.
- LECOQ (M.). — Recherches expérimentales sur les vitamines B contenues dans les levures, dans leurs extraits et dans les milieux de culture. — *Th. Doct. ès-sciences*, Paris, 1928.
- LINOSSIER (G.) et ROUX (G.). — Sur la nutrition du champignon du muguet. — *C. R. Ac. Sc.*, 1890, **110**, 355.
- LLOYD (F.). — The effect of acids and alkalis on the growth of the protoplasm in pollen tubes. — *Mem. Torr. Bot. Club.*, 1918, **17**, 84.
- LOEB (J.). — Proteins and the theory of colloidal behaviour. *Pps* 1922, New-York, 292. Les protéines, traduction française. — *Paris*, 1924.
- LUNDEGÅRDH (H.). — Der Einfluss der Wasserstoffionen Konzentration in gegenwart von Salzen auf das wachstum von *Gibberella Saubinetii*. — *Bioch. zeits*, 1924, **146**, 564.
- MAILLARD (M.). — Action de la glycérine et des sucres sur les acides α aminés. — *Thèse Doct. Sciences*, 1913, Paris.
- MATRUCHOT (L.). — Une mucorinée purement conidienne. *Cunninghamella africana*. — *Ann. Mycologici*, 1903, **1**, 45.
- MEACHAM (M.). — Note upon the hydrogen ion concentration necessary to inhibit the growth of four wood destroying fungi. — *Science*, n. s 1918, **48**, 400.
- MEVIUS (W.). — Wasserstoffionen Konzentration und Permeabilität bei Kalkfeindlichen gewachsen. — *Zeits f. Bot.*, 1924, **16**, 641.
- MOORE (E.). — The physiology of *Fusarium cæruleum*. — *Ann. of Bot.*, 1924, **38**, 137.
- NÄSSLUNG (C.) und DERNBY (K.). — Untersuchungen über einige physiologische Eigenschaften der Strahlenpilze. — *Bioch. Zeits*, 1923, **138**, 497.

- NICLOUX (M.). — Oxydation de glucose en solution alcaline avec production d'oxyde de carbone. Particularités de cette réaction. Manière de se comporter de différents glucides. — *C. R. Soc. Biol.*, 1928, **93**, 1225, 1548, **99**, 226.
- OLSEN (C.). — Studies over jordbundens brintionkonzentration og dens betydning for vegetationen, saerlig for plantefordelingen i naturen. — *Midd. Carlsbergslaboratorium*, 1921.
- OSTERHOUT (W.) (1). — The effect of alkali on permeability. — *Journ. of Biol. Chem.*, 1914, **19**, 335.
— (2). — The effect of acid on permeability. — *Journ. of Biol. Chem.*, 1914, **19**, 493.
- PEARSALL (W.) and EWING (J.). — The isoelectric points of some plant proteins. — *The biochemical Journ.*, 1914, **18**, 329.
- PRATT (C.). — The staling of fungal cultures. I. General and chemical investigations of staling by *Fusarium*. — *Ann. of Bot.*, 1924, **38**, 563.
- RITTER (G.). — Die giftige und formative Wirkung der Säuren auf die Mucoraceen und ihre beziehung zur Mucorhefebildung. — *Jahr. f. wiss. Botan.*, 1912, **52**, 351.
- ROBBINS (W.) (1) An isoelectric point for plant tissue and its significance. — *Am. Journ. of Bot.*, 1923, **10**, 412.
— (2) Isoelectric points for the mycelium of fungi. — *Journ. of Gen. Physiol.*, 1924, **6**, 259.
- SALTER (R.) and MAC ILVAINE (T.). — Effect of the reaction of the solution on the germination of seeds and growth of seedlings. — *Journ. Agri. Res.*, 1920, **19**, 73.
- SCHMITZ (H.). — Studies in the physiology of fungi. The relation of bacteria to cellulose fermentation induced by fungi, with special reference to the decay of wood. — *Ann. Miss. bot. Gard.*, 1919, **6**, 93.
- SCHRÖTER (J.). — Ueber die auf Hutmilzen vorkommenden Mucorineen. — *Jahr. d. Sches. Ger. f. vaterl. Kult.*, Bd 64.
- STEINBERG (R.). — A study of some factors in the chemical stimulation of the growth of *Aspergillus niger*. — *Am. Journ. of Bot.*, 1919, **6**, 330.
- STEVENS (F.). — The effect of aqueous solutions upon the germination of fungus spores. — *Bot. Gazette*, 1898, **26**, 377.
- TANRET (C.) (1). — Action du nitrate d'ammoniaque sur l'*Aspergillus*. — *C. R. Ac. Sc.*, 1896, **123**, 948.
— (2) Action des nitrate, sulfate, chlorhydrate et phosphate d'ammoniaque sur l'*Aspergillus niger*. — *Bull. Soc. Chim.*, 1896, **17**, 914.
- TETSU SAKAMURA. — Ueber die Kultur von *Aspergillus niger* mit besonderer Rücksicht auf das Puffervermogen des Nährlösung. — *Journ. of coll., of Agric., Hokkaido Imper. Univ.*, 1924, **14**, 65.
- THAXTER (R.). — Mycological notes 1. 2. I A New England Choanephora — *Rhodora*, 1903, **5**, 97.
- THOMAS (A.) and KELLY (M.). — The isoelectric point of collagen. — *Journ. Am. Chem. Soc.*, 1912, **44**, 195.
- VAN TIEGHEM (P.) (1). — Nouvelles recherches sur les Mucorinées. — *Ann. des Sc. nat. Bot.*, 1875 [6] **1**, 94.

- VAN TIEGHEM (P.) (2). — Troisième mémoire sur les Mucorinées. — *Ann. Sc. Nat. Bot.*, 1876 [6] **4**, 390.
- VAN TIEGHEM et LE MONNIER. — Recherches sur les Mucorinées. — *Ann. Sc. nat. Bot.*, 1873 [5] **17**, 305.
- WAKSMAN (S.) and JOFFE (J.). — Studies in the metabolism of *Actinomyces*. 4. Changes in reaction as a result of the growth of *Actinomyces* upon culture media. — *Journ. Bact.*, 1920, **5**, 31.
- WEBB (R.) (1). — Studies in the physiology of the fungi. X Germination of the spores of certain fungi in relation to hydrogen ion concentration. — *Ann. Miss. Bot. Gard.*, 1919, **6**, 201.
- (2). — Studies in the physiology of the fungi XV. Germination of the spore of certain fungi in relation to hydrogen ion concentration. — *Ann. Miss. Bot. Gard.*, 1921, **8**, 283.
- WILDIERS. — Nouvelle substance indispensable au développement de la levure. — *La Cellule*, 1901, **18**, 313.
- WINSLOW (C.), FALK (I.) and CAULFIELD (M.). — Electrophoresis of bacteria as influenced by hydrogen ion concentration and the presence of sodium and calcium salts. — *Journ. of Gen. physiol.*, 1924, **6**, 177.
- WOLPERT. — Studies in the physiology of fungi XVII. The growth of certain wood destroying fungi in relation to the H ion concentration of the media. — *Ann. Miss. Bot. Gard.*, 1924, **11**, 43.
- ZELLER (S.). — *Lenzites saepiaria* Fries with special reference to enzyme activity. — *Ann. Miss. Bot. Gard.*, 1916, **3**, 439.
- ZELLER (S.), SCHMITZ (H.) and DUGGAR (B.). — Growth of wood destroying fungi on liquid media. — *Ann. Miss. Bot. Gard.*, 1919, **6**, 137.

TABLE DES MATIÈRES

	Pages
INTRODUCTION	9
HISTORIQUE	10
LES MÉTHODES D'ÉTUDE.	23
1 ^o Les organismes étudiés.	23
2 ^o Milieu de culture	25
3 ^o Méthode d'examen des gouttes pendantes.	35
PARTIE EXPÉRIMENTALE	39
CHAPITRE PREMIER. — <i>Utilisation de l'ion nitrique</i>	39
CHAPITRE II. — <i>Utilisation de l'ion ammoniacal.</i>	49
CHAPITRE III. — <i>Utilisation de l'azote des amino-acides</i> . . .	57
CHAPITRE IV. — <i>Utilisation de l'azote peptidique.</i>	69
DISCUSSION GÉNÉRALE.	77
CONCLUSIONS	81
INDEX BIBLIOGRAPHIQUE	83
